

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio

# Elektrochemische Detektion von PCR-Produkten in Realproben

---

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Dipl. Biol. Maren Mix, geboren am 21.12.1975 in Lübeck

---

Gutachter:

1. Gutachter:

PD. Dr. Gerd-Uwe Flechsig,  
Institut für Chemie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Frank-Michael Matysik  
Institut für Analytische Chemie, Universität Regensburg

Datum der Einreichung: 15. Februar 2013

Datum der Verteidigung: 02. Juli 2013

---

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von 2007 bis 2012 an der Universität Rostock, Institut für Chemie, Abteilung Analytische und Technische Chemie in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Gerd-Uwe Flechsig.

---

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine außer den von mir angegebenen Hilfsmittel oder Quellen verwendet und die den benutzten Werken entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 28.01.2013

Maren Mix

---

## Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, bedanken. Zudem ermöglichte er mir die Teilnahme an verschiedenen nationalen und internationalen Tagungen, wo ich die Ergebnisse meiner Arbeit vorstellen und diskutieren konnte.

Ein herzlicher Dank gilt Dr. Annette-Enrica Surkus, Dr. Heiko Duwensee, Dr. Falko Wachholz und Dr. Thomas Reske, die stets bereit waren, mich in die Geheimnisse der Elektrochemie einzuführen und meinen Erkenntnisstand durch fachliche Diskussionen zu bereichern.

Simone Krüger danke ich für die Unterstützung bei der Laborarbeit und das freundschaftliche Klima im Labor.

Harald Grabow danke ich für die Versuche, mir die Elektrotechnik und Elektronik näherzubringen sowie seine Fähigkeit, nahezu alles zu reparieren bzw. seine Bereitschaft, es zu versuchen.

Dr. Sabine Haack und Frau Petra Sattler danke ich für die gute Zusammenarbeit, nicht nur während der Betreuung des Praktikums.

Dank gebührt außerdem Dr. Sabine Haack und Martin Jacobsen für das Korrekturlesen dieser Arbeit und hilfreiche Anmerkungen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmermann und der Elektrochemie, namentlich zusätzlich zu den bereits genannten Katarzyna Biala, Hilal Diab, Sven Ehlert, Nick Hartmann, Xiaoqi Ni, Hanna Sopha und Anne Walter, möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und auch gemeinsam verbrachte Freizeit danken.

Dank gebührt außerdem unseren Kooperationspartnern:

- Prof. Hubert Bahl und Mitarbeitern für die Kooperation bei der Publikation 2 und die Sequenzen von *Clostridium acetobutylicum*.
- Prof. Inge Broer und Mitarbeitern für die Kooperation bei den Publikationen 5+6, die Sequenzen vom Mais und die Maismehlproben.

- 
- Prof. Jan Gimsa und seinen Mitarbeitern Marco Stubbe und Marcel Adler für die Kooperation bei der Publikation 4 und die FEM-Simulationen.
  - Prof. Lienhard Pagel und seinen Mitarbeitern Stefan Gaßmann, Holger Götze und Matthias Hinze, den Mitarbeitern der Gensoric GmbH, den Mitarbeitern der Immungenetics AG, Steffen Bruck (LB Engineering GbR) und Arndt Kritzner (Logic Way GmbH) für die Kooperation bei dem Projekt „WK-Potential – Echtzeit PCR mit Elektrochemischem Sensor in Fluidikboard“.
  - Kanzlei Uexküll & Stollberg und Mitarbeiterin Solveig Moré für die Unterstützung bei der Patentanmeldung

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der DFG, dem Land Mecklenburg-Vorpommern und dem BMBF.

Ich danke meiner Familie, ganz besonders aber meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester, für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung. Vielen Dank für das Vertrauen und den Rückhalt.

## **Lebenslauf**

### ***Persönliches***

Name: Maren Mix  
Geburtstag und -ort: 21.12.1975, Lübeck  
Nationalität: deutsch

### ***Ausbildung***

1982-1986 " Pestalozzi-Grundschule" in Lübeck  
1986-1995 "Carl-Jacob-Burckhardt-Gymnasium" in Lübeck, Abschluss: Abitur,  
Gesamtnote: 2,0  
1995-2001 Biologiestudium an der Universität Rostock, Abschluss: Diplom,  
Gesamtnote: sehr gut

### ***Berufserfahrung***

01.04.02- 30.9.02 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Rostock,  
Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie, Prof. Bahl  
01.10.02-31.03.05 Promotions-Stipendiatin der Landesgraduiertenförderung  
Mecklenburg-Vorpommern  
01.04.05-30.09.05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Rostock,  
Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie, Prof. Bahl  
01.09.06-31.05.13 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Rostock,  
Institut für Chemie/Analytische und Technische Chemie, PD Dr.  
Gerd-Uwe Flechsig  
Seit 15.07.13 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Bioserv Analytik und  
Medizinprodukte

### ***Auslandsaufenthalt***

25.08.03-15.02.04 Forschungsaufenthalt an der Northwestern University, Evanston,  
Illinois, USA, Department of Chemical and Biological  
Engineering, Prof. Papoutsakis

## Publikationsliste

Die vorliegende Dissertation ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen, die sich mit der elektrochemischen Detektion von PCR-Produkten in Realproben beschäftigen, bzw. die Voruntersuchungen für die Konstruktion eines elektrochemischen DNA-Arrays darstellen. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

1. Duwensee H, Mix M, Flechsig G-U: Sequence-specific Electrochemical Detection of Nucleic Acids in Real Samples. *Bioanal. Rev.* 2 (1-4); 2010; 103-114
2. Reske T, Mix M, Bahl H, Flechsig G-U: Electrochemical detection of osmium tetroxide labeled PCR products by means of protective strands. *Talanta* 74 (3); 2007; 393-397
3. Mix M, Reske T, Duwensee H, Flechsig G-U: Electrochemical detection of asymmetric PCR products by labeling with osmium tetroxide. *Electroanalysis* 21 (7); 2009; 826-830
4. Duwensee H, Mix M, Stubbe M, Adler M, Gimsa J, Flechsig G-U: Electrochemical Product Detection of an Asymmetric Convective Polymerase Chain Reaction. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2); 2009; 400-405
5. Duwensee H, Mix M, Broer I, Flechsig G-U: Electrochemical detection of modified maize gene sequences by multiplexed labeling with osmium tetroxide bipyridine. *Electrochem. Comm.* 11 (7); 2009; 1487-1491
6. Mix M, Rürger J, Krüger S, Broer I, Flechsig G-U: Electrochemical detection of 0.6 percent genetically modified maize MON810 in real flour samples. *Electrochem. Comm.* 22; 2012; 137-140
7. Flechsig G-U, Mix M, Krüger S: Verfahren und Vorrichtung zur sequenzspezifischen Analyse von Nukleinsäuren. DE-Patent 10 2011 114 984 B3 (2011), PCT-Anmeldung PCT/EP2012/068818



Publikation	eigene Beiträge
1	Literatur-Recherche und wesentlicher Anteil am schriftlichen Beitrag zur Publikation
2	Durchführung der meisten molekularbiologischen Versuche  (Herstellung der Targets durch PCR, Abbau des Doppelstrangs durch $\lambda$ -Exonuklease und Reinigung des Einzelstrangs, Analyse der DNA im Agarosegel)  Auswertung dieser Versuche, schriftliche und graphische Beiträge zur Publikation
3	Durchführung und Planung der molekularbiologischen Versuche und Unterstützung bei den elektrochemischen Versuchen  (Herstellung der Targets durch asymmetrische PCR inkl. Optimierung, Analyse der DNA im Agarosegel)  Auswertung dieser Versuche, schriftliche und graphische Beiträge zur Publikation
4	Durchführung und Planung der molekularbiologischen Kontrollexperimente, Beteiligung an den elektrochemischen Experimenten, Beteiligung an der Auswertung der elektrochemischen und molekularbiologischen Experimente, schriftliche und graphische Beiträge zur Publikation
5	Beteiligung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, schriftliche und graphische Beiträge zur Publikation
6	Planung und Durchführung der meisten Experimente, wesentlicher Anteil an den schriftlichen und graphischen Beiträgen zur Publikation
7	Durchführung und Planung aller notwendigen Experimente, schriftliche und graphische Beiträge zur Publikation

## Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste .....	i
Inhaltsverzeichnis.....	iii
Abkürzungen .....	v
Abbildungsverzeichnis.....	vi
1. Zielsetzung .....	1
2. Einleitung .....	2
3. Theoretische Grundlagen .....	4
3.1. DNA.....	4
3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	6
3.3. Gelelektrophorese .....	8
3.4. Chemische Sensoren.....	10
3.4.1. Hybridisierungssensoren .....	11
3.5. Elektrochemische Methoden.....	12
3.5.1. Zyklische Voltammetrie (CV) .....	12
3.5.2. Square-Wave Voltammetrie (SWV) .....	13
3.6. Elektrochemische Detektionsmethoden für DNA (Pub. 1).....	14
3.6.1. Detektion von unmarkierter DNA.....	15
3.6.2. Detektion von markierter DNA.....	16
4. Ergebnisse und Diskussion.....	23
4.1. Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten – Herstellung der Einzelstränge mittels Exonuklease (Pub. 2).....	23
4.2. Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten – Herstellung der Einzelstränge mittels asymmetrischer PCR (Pub. 3).....	25
4.3. Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten – Herstellung der Einzelstränge mittels konvektiver PCR (Pub. 4).....	27
4.4. Multiple Markierung verschiedener Oligonukleotid-Targets (Pub. 5).....	29
4.5. Nachweis kleiner Mengen von gentechnisch verändertem Mais in Maismehlproben (Pub. 6) .....	31
4.6. Verfahren zur sequenzspezifischen Detektion von Nukleinsäuren (Pub. 7) .....	34
5. Zusammenfassung.....	36
6. Ausblick .....	38

7. Literatur .....	41
8. Publikationen .....	56
Publikation 1 .....	56
Publikation 2 .....	69
Publikation 3 .....	75
Publikation 4 .....	81
Publikation 5 .....	88
Publikation 6 .....	94
Publikation 7 .....	99

## Abkürzungen

b	Basen
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	komplementär
CC	Chronocoulometrie
CV	Cyclic Voltammetry (Zyklische Voltammetrie)
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPV	Differential Pulse Voltammetry (Differential Puls Voltammetrie)
ds	doppelsträngig
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-1-Carbodiimid Hydrochlorid
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
Fig.	Figure (Abbildung in einer Publikation)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
i.d.R.	in der Regel
IUPAC	International Union Of Pure and Applied Chemistry
kBp	Kilobasenpaar
MB	Methylenblau
min	Minuten
NC	Nicht-komplementär
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Pub.	Publikation
qRT-PCR	Real-Time PCR
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase
SAM	Self-assembled Monolayer (Selbstorganisierende Monoschicht)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
ss	single-stranded (einzelnsträngig)
SWV	Square-Wave Voltammetry (Square-Wave-Voltammetrie)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Nukleotide .....	4
Abbildung 2: Chemische Struktur der DNA .....	5
Abbildung 3: Grafische Darstellung der PCR .....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Modifizierung einer Goldelektrode mittels Diazoniumsalz, .....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Modifizierung einer Goldelektrode mit einer SAM .....	12
Abbildung 6: Zyklisches Voltammogramm des Redoxsystems $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ in wässrigem Elektrolyten .....	13
Abbildung 7: Spannungs-Zeit-Funktion (A) und Strom-Spannungs-Kurve der SWV (B) .....	14
Abbildung 8: Redoxreaktion von Methylenblau bei $pH > 6$ .....	17
Abbildung 9: Darstellung der Reaktion von Osmiumtetroxidbipyridin mit der Base Thymin .	19
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Markierung von DNA mit $[OsO_4(bipy)]$ und der Detektion an der Goldelektrode .....	20
Abbildung 11: Schematische Darstellung des $\lambda$ -Exonuklease-Abbaus.....	24
Abbildung 12: 3x 3'-Disulfid- Linker der Firma Friz Biotech GmbH.....	25
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines PCR-Eppis (A) und des elektrotechnischen Aufbaus für eine Temperaturkalibrierung (B).....	28
Abbildung 14: Sonde 810 mit verschiedenen Mischtargets .....	30
Abbildung 15: Einfluss der Hybridisierungszeit auf die SWV-Signale .....	32
Abbildung 16: Hybridisierungssignale der Sequenz CRY .....	33
Abbildung 17: Foto des Prototyps eines DNA-Arrays (A) und seiner Wärmezonen (B) .....	39

## 1. Zielsetzung

Elektrochemische Methoden zur Detektion von DNA-Hybridisierungen werden seit etwa 20 Jahren intensiver erforscht. Häufig werden dabei für die Entwicklung neuer Sensorsysteme oder Detektionsmethoden künstliche Oligonukleotide als Untersuchungsobjekt verwendet.

Sobald diese Methoden auf reale Proben angewandt werden, stellt sich für den Experimentator das Problem, dass er nicht nur die gesuchte DNA-Sequenz, sondern darüber hinaus noch eine große Menge nicht-spezifischer DNA vorliegen hat, die die Messungen stören könnte. Auch weitere Matrixelemente, wie zum Beispiel Komponenten der PCR-Lösung, könnten sich äußerst störend auf die elektrochemischen Messungen auswirken. Außerdem liegt in der Natur die DNA in der Regel doppelsträngig vor. Diese Doppelstränge müssen vor einem Hybridisierungsassay voneinander getrennt werden, um eine Hybridisierung mit einer immobilisierten Sonde auf einer Elektrode zu ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die in der Arbeitsgruppe vorliegenden Erkenntnisse zur Markierung von Oligonukleotiden auf PCR-amplifizierte Targets anzuwenden. Dabei wurden zunächst künstliche Templates für die PCR eingesetzt. Einzelstränge wurden aus den erhaltenen PCR-Produkten entweder durch enzymatischen Abbau eines der Stränge der DNA erhalten oder durch asymmetrische PCR, in der neben dem Doppelstrang auch einzelsträngige DNA (ssDNA) produziert wird.

Letztere Methode wurde des Weiteren verwendet, um gentechnisch veränderten Mais zu untersuchen. Dabei sollten im Wesentlichen zwei Maisgene sowie zwei Sequenzen, die das Vorhandensein der gentechnischen Veränderung im Mais und die korrekte Lokalisation dieser Veränderung im Maisgenom belegen, untersucht werden.

Darüber hinaus sollte nicht nur das Vorhandensein dieser Sequenzen in verschiedenen Maismehlproben, sondern auch möglichst ein konzentrationsabhängiger Nachweis der gentechnischen Veränderung in verschiedenen Maismehlgemischen erfolgen.

## 2. Einleitung

DNA als Träger der Erbinformation ist ein interessantes Biomolekül, dessen sequenzspezifischer Nachweis bei einer Vielzahl von molekularbiologischen [1], medizinischen [2-4] und forensischen Fragestellungen [5, 6] von Bedeutung ist. Dabei beruht nach wie vor ein Großteil der etablierten Untersuchungsmethoden auf der Detektion mittels optischer Methoden wie der Färbung von Agarosegelen mit Ethidiumbromid, Nachweis der Nukleinsäuren im Blot mittels radioaktiv oder DIG-markierter Sonden oder Fluoreszenzmarkern [1]. Bei all diesen Methoden gibt es wesentliche Nachteile. Die Färbung von DNA in Agarosegelen erfolgt häufig mit toxischen oder kanzerogenen Stoffen, die verschiedenen Methoden des Blottens von Nukleinsäuren sind nicht nur sehr zeitaufwändig durch die Übertragung der Nukleinsäure auf die Membran, die folgenden Waschschriffe und die langwierige Hybridisierung mit den Sonden, sondern erfordern während der Detektion der Hybridisierung auch noch spezielle Labore (im Fall der radioaktiv markierten Sonden) oder sind sehr kostspielig (im Fall der DIG-markierten Sonden). Letzteres ist ebenfalls ein Nachteil beim Einsatz von Fluoreszenzmarkern bzw. mit Fluoreszenzmarkern markierten Sonden beispielsweise in der Real-Time PCR (qRT-PCR). Daher werden zunehmend Methoden gesucht, die die Analyse von DNA günstiger machen und die dafür nötigen Geräte verkleinern.

Eine Möglichkeit dafür stellt die elektrochemische Detektion von DNA dar. Allein die exponentielle Zunahme der Artikel (nach Web of Knowledge: bis 1990 knapp 30 Artikel, von 1991-2000 fast 500 Artikel, ab 2000 bis heute 5770 Artikel, Sucheingabe: „electrochemical detection“ und „DNA“ in dem Bereich „Topic“) zeigt das wachsende Interesse an diesen Methoden, die die Bereiche der Molekularbiologie mit der analytischen Chemie verbinden.

Einer der Pioniere auf dem Gebiet der elektrochemischen Detektion von DNA ist Palecek, der bereits in den späten 50er Jahren des 20. Jahrhunderts zeigte, dass Nukleinsäuren polarographisch nachgewiesen werden können [7, 8]. Die Arbeitsgruppe um Palecek war es auch, die den elektroaktiven Marker Osmiumtetroxid einführte [9, 10]. Ein weiterer Durchbruch war die sequenzspezifische Detektion von DNA, wie sie 1993 von Millan und Mikkelsen beschrieben wurde [11]. Inzwischen wurde die elektrochemische Detektion von DNA mehrfach aus verschiedenen Perspektiven rezensiert [12-25]. Dabei kann die

elektrochemische Detektion auf verschiedenen Wegen erfolgen: Zum Einen gibt es unterschiedliche Wege der markierungsfreien Detektionen [26-29]. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, die DNA mit Hilfe einer Markierung zu detektieren. Dabei kann diese Markierung entweder eine redoxaktive Substanz sein, die sich in die doppelsträngige DNA (dsDNA) aus Sonde und Target einlagert [30-32] oder es kann sich um eine kovalent gebundene Markierung handeln. Diese kann entweder darauf beruhen, dass die zu suchende DNA markiert ist [33, 34] oder dass nach der Hybridisierung zwischen Sonde und Target ein markierter Reporterstrang an eine freie Stelle des Targets bindet [35]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, an die Sonde einen markierten Reporterstrang zu hybridisieren, der dann von dem nicht-markierten Target verdrängt wird. Dabei wird ein vorhandenes elektrochemisches Signal verkleinert [36].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der kovalenten Markierung des Targetstranges gewählt. Dafür wurde der von Palecek eingeführte Marker  $[(OsO_4)bipy]$  verwendet [37]. Der Komplex reagiert mit den Pyrimidinbasen der DNA, Thymin und Cytosin, sowie Uracil in RNA. Dabei werden die Osmat(VI)ester unter Oxidation der Pyrimidinringe gebildet [10]. Da der Komplex nur mit ssDNA reagiert, diese markierte DNA dann aber nicht mehr mit ihrem komplementären Strang hybridisieren kann, wurde die Markierung unter Verwendung eines Schutzstrangs durchgeführt, wie sie in der Arbeitsgruppe um Flechsig entwickelt und patentiert wurde [38, 39]. Einer der wesentlichen Aspekte dieser Arbeit ist die Übertragung der bekannten Methode auf den Einsatz bei PCR-Produkten und Realproben. Dabei galt es, verschiedene Methoden zu entwickeln, um die normalerweise doppelsträngigen PCR-Produkte in ssDNA umzuwandeln, damit die Markierung ermöglicht wird. Darüber hinaus wurden verschiedene Methoden entwickelt und untersucht, die für die Konstruktion eines elektrochemischen Sensors für mehrere Realproben parallel erforderlich sind.



### 3. Theoretische Grundlagen

#### 3.1. DNA

Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid, DNA) ist eine Nukleinsäure, die in allen lebenden Organismen als Träger der Erbinformation dient. In einigen Viren kann diese Funktion von der RNA übernommen werden. Die Struktur der DNA wurde 1953 von Watson und Crick postuliert [40]. Diese definierten die DNA als zwei helikale, gegenläufige Ketten, die um eine gemeinsame Achse gewunden sind, während sich die Basen im Zentrum dieser Ketten gegenüber stehen. Die einzelnen Bausteine der DNA, die Nukleotide, bestehen aus einem Phosphatrest, der über die Hydroxylgruppe des 5'-Kohlenstoffs der Pentose Desoxyribose mit dieser verestert ist und einer Pyrimidin- oder Purinbase, die mit der Pentose über eine glykosidische Bindung an deren 1'-Kohlenstoff verknüpft ist. Als Nucleosid beschreibt man den Baustein bestehend aus Base und Desoxyribose. Dieser Aufbau ist schematisch in der Abbildung 1 dargestellt.

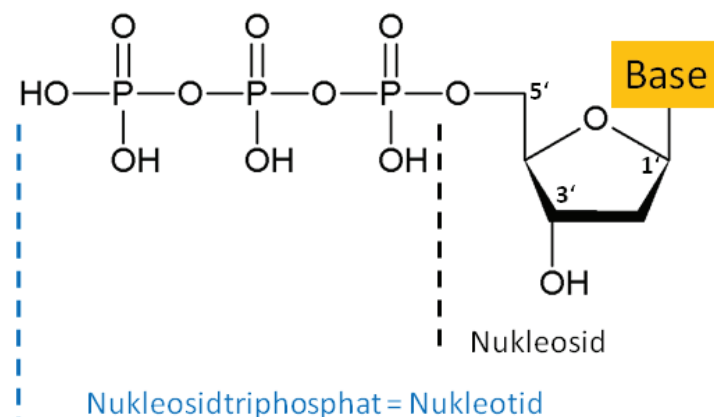


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Nucleotide

Die Pyrimidinbasen sind Thymin und Cytosin, die Purinbasen sind Adenin und Guanin, wobei in der DNA die Basen Adenin und Thymin über zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Cytosin und Guanin über drei Wasserstoffbrückenbindungen komplementär verbunden sind [41], wie es in der Abbildung 2 dargestellt ist.

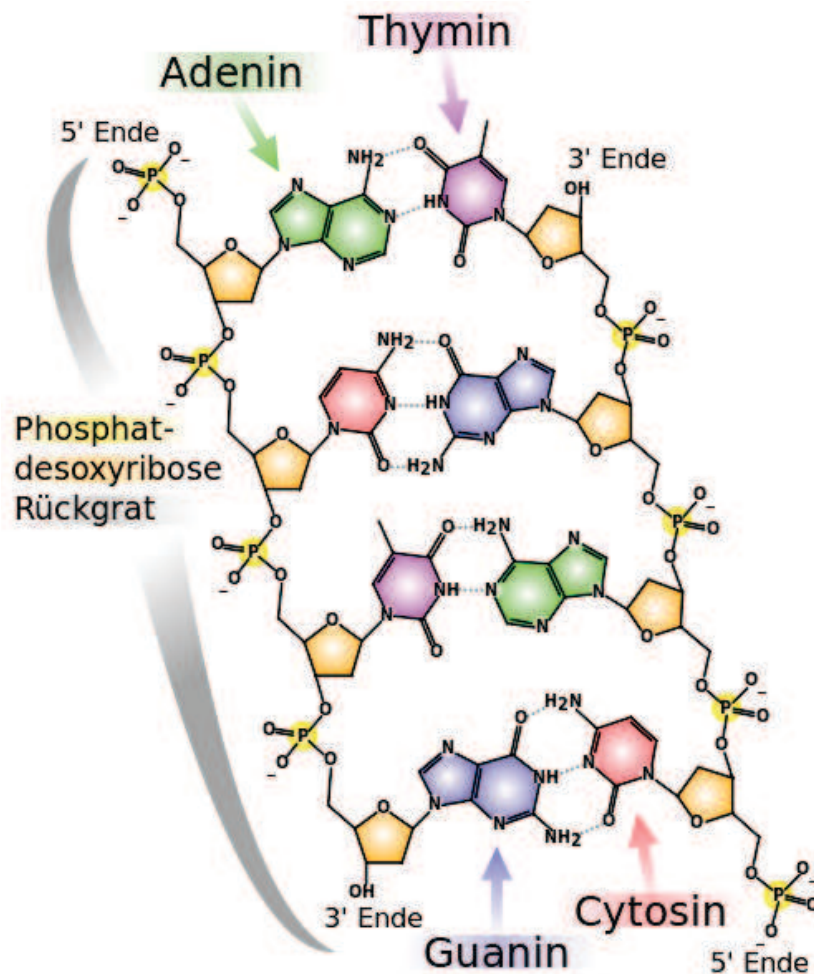


Abbildung 2: Chemische Struktur der DNA  
 entnommen von [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA\\_chemical\\_structure.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg) vom  
 10.01.2013

Diese komplementäre Basenpaarung stellt die Grundlage dafür dar, dass bei der DNA-Replikation während der Zellteilung die Sequenz der DNA erhalten bleibt und damit die genetische Information auf die nächste Generation übertragen wird. Darüber hinaus bildet es in der Molekularbiologie die Grundlage verschiedener Detektionsmethoden von Nucleinsäuren, bei denen eine Sonde mit einem komplementären Target-Strang hybridisiert und diese Hybridisierung in einer bestimmten Form detektiert wird. Eine der ersten Methoden, die DNA sequenzspezifisch zu detektieren, wurde dabei 1975 von Southern [42] entwickelt. Dabei wird die DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran transferiert und dort fixiert. Die Hybridisierung der DNA auf der Membran erfolgt mit einer in Lösung befindlichen Sonde (radioaktiv oder DIG-markiert). Der Nachweis dieser Hybridisierung kann dann optisch erfolgen. Analog dazu erfolgt die Detektion von RNA im Northern Blot [43]. Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse von Nucleinsäuren mit Microarrays. Diese werden

im Wesentlichen dazu eingesetzt, Unterschiede auf genomischer Ebene zwischen verschiedenen Organismen zu erhalten oder unterschiedliche Transkriptionsmuster innerhalb eines Organismus zu untersuchen [44]. Ein weiteres Einsatzgebiet von Microarrays ist die forensische Analyse, in der sie zum Beispiel für die SNP-Analyse eingesetzt werden können [45].

In der Regel liegt DNA in ihrer natürlichen Form als Doppelstrang vor. Die Auftrennung in Einzelstränge wird als Schmelzen oder Denaturierung bezeichnet, wobei dieser Prozess im Gegensatz zu der Denaturierung von Proteinen meistens reversibel ist. Die Denaturierung kann durch erhöhte Temperatur oder durch eine mild-alkalische Behandlung erfolgen [46]. Der Schmelzpunkt der DNA richtet sich dabei nach der Länge der DNA, der Ionenstärke des Lösungsmittels und der Sequenz der DNA [46].

### **3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA. Dabei hat sie sich seit ihrer Erfindung im Jahr 1986 [47] zu einer weit in der Biologie und Medizin verbreiteten Methode entwickelt [48]. Für die PCR werden zwei kurze einzelsträngige Oligonukleotide, die komplementär zu den Enden einer bestimmten Zielsequenz sein müssen, benötigt. Darüber hinaus muss diese Zielsequenz als Matrize (Template) vorliegen. Des Weiteren werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine thermostabile Polymerase mit dem entsprechenden Puffersystem benötigt [48].

Die PCR erfolgt in der Regel nach folgendem Schema (grafisch in Abbildung 3 dargestellt):

1. Denaturierung der DNA: Durch Erhitzen auf über 90 °C wird die dsDNA aufgeschmolzen.
2. Annealing der Primer: Die Primer lagern sich an die komplementären Abschnitte in der Matrizen-DNA an. Dieser Schritt erfolgt meist bei 50-60 °C. Es ist darauf zu achten, dass die Annealingtemperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Primer liegt.
3. Elongation: Die Synthese der DNA erfolgt durch Einbau der dNTPs durch die Polymerase entsprechend der komplementären Matrize. Die Temperatur dieses Schritts wird durch das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase bestimmt und liegt i.d.R. zwischen 72 und 75 °C.

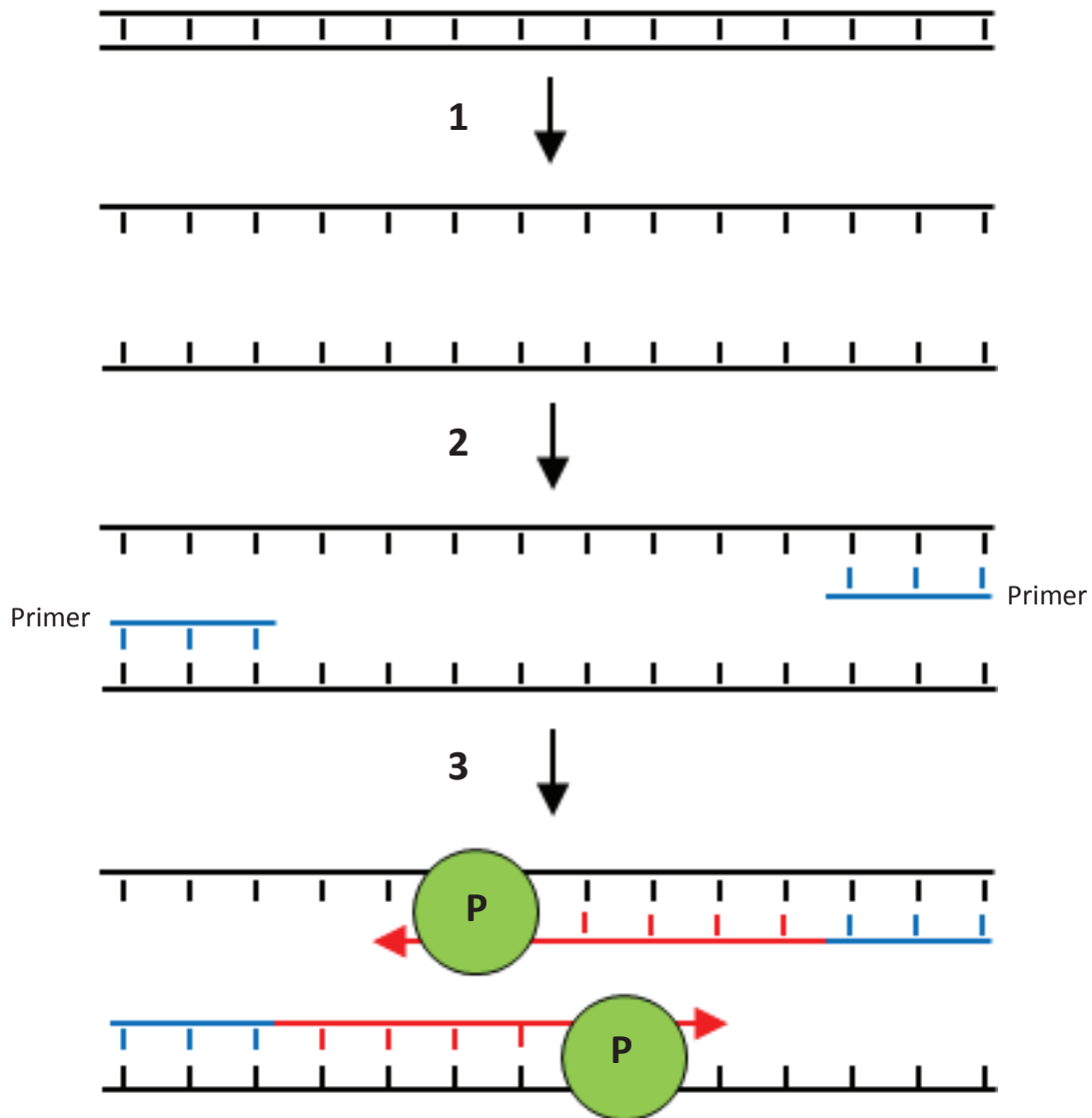


Abbildung 3: Grafische Darstellung der PCR

Schritt 1: Denaturierung, Schritt 2: Anlagerung der Primer (Annealing), Schritt 3: Synthese der DNA durch die Polymerase (P) entlang der komplementären Matrize (Elongation)

Die ersten Experimente zur PCR erfolgten mit nicht thermostabiler Polymerase [47]. Diese hatten den Nachteil, dass nach jedem Denaturierungsschritt neues Enzym zugegeben werden musste. Das verhinderte die Automatisierung der PCR und war darüber hinaus äußerst zeitintensiv und für Standardanwendungen aufgrund des hohen Verbrauchs an Enzym zu teuer. Der Durchbruch der Methode erfolgte mit Hilfe der Einführung thermostabiler Polymerasen [49]. Diese werden heute durch eine große Vielzahl von Firmen mit verschiedensten Spezifikationen vertrieben.

Die PCR wird in vielen Feldern eingesetzt. So werden mittels PCR DNA-Sequenzen amplifiziert, um sie in Vektoren zu ligieren [50-52] oder sie als Sonden zu verwenden [53].

Sie kann auch eingesetzt werden, um Mutagenese zu betreiben [54, 55] oder nach verschiedenen Mutationen oder Krankheiten zu suchen [4, 56]. Ein weiteres Einsatzgebiet der PCR liegt in dem Bereich der forensischen Analyse. Hier wird die PCR eingesetzt, um genetische Fingerabdrücke zu erstellen [57, 58] oder mögliche Vaterschaften zu klären [48]. Darüber hinaus kann die PCR auch genutzt werden, um Mikroorganismen nachzuweisen und damit Qualitätskontrollen im Bereich der Wasseranalyse oder verschiedener Produktionsprozesse zu betreiben [59-62]. Bei den meisten dieser Anwendungen werden die Primer im äquimolaren Verhältnis eingesetzt (symmetrische PCR), was eine exponentielle Vermehrung der DNA innerhalb der PCR zur Folge hat. Daneben gibt es noch die asymmetrische PCR, bei der ein Primer in hohem Überschuss zugegeben wird und das PCR-Produkt lediglich linear vermehrt wird [48]. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass ein überwiegend einzelsträngiges PCR-Produkt entsteht [63], welches in der vorliegenden Arbeit für die Markierung der Targets benötigt wurde.

### 3.3. Gelelektrophorese

In der Elektrophorese werden die einzelnen Bestandteile eines Teilchengemisches aufgrund ihrer Ladung und Größe in einem elektrischen Gleichstromfeld voneinander getrennt. Die Gelelektrophorese gehört dabei zur der Untergruppe der Zonenelektrophorese mit einem homogenen Puffer und einer stabilisierenden Matrix [64].

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens ( $v$ ) wird bei der Elektrophorese von der elektrischen Feldstärke ( $F$ ), der Nettoladung des Teilchens ( $Q$ ) sowie dem Reibungskoeffizienten ( $f$ ) bestimmt [64]:

$$v = \frac{Q * F}{f}$$

Der Reibungskoeffizient hängt im Wesentlichen von der Größe und Form des geladenen Teilchens, sowie der Viskosität des Puffersystems und der Porengröße der Trägermatrix ab. Das Agarosegel wirkt wie ein Molekularsieb. Für kugelförmige Teilchen kann nach Stokes der Reibungskoeffizient ermittelt werden [64]:

$$f = 6 * \pi * r * \eta$$

Dabei ist "r" der Teilchenradius, bzw. in diesem Fall der Hydratradius und "η" die Viskosität des Mediums.

Dies gilt nicht für alle Formen, für z.B. langgestreckte Moleküle können nur Näherungswerte berechnet werden. Darüber hinaus beeinflussen die an den Elektroden angelegte Spannung (U) und der Elektrodenabstand (d) die Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen [64]:

$$F = \frac{U}{d}$$

Da Reibungskraft und Wanderung gegenläufig sind, bewegt sich ein geladenes Teilchen mit konstanter Geschwindigkeit im elektrischen Feld. Man spricht dabei von elektrophoretischer Mobilität (μ) [64]:

$$\mu = \frac{v}{F}$$

Die elektrophoretische Mobilität zweier zu trennender Teilchen muss i.d.R. unterschiedlich sein, um eine Trennung in der Elektrophorese zu gewährleisten. Da bei der DNA das Verhältnis von Ladung zu Hydratradius und damit zur Größe bei unterschiedlichen Längen nahezu identisch bleibt, ist bei ihrer Auftrennung im Agarosegel der Molekularsiebeffekt für die Trennung wesentlicher.

Als Trägermatrix für die Gelelektrophorese wird zur Trennung von DNA in der Regel Agarose verwendet. Agarose wird aus den Zellwänden ausgewählter Rotalgen (Rhodophyceae) gewonnen und besteht aus 1,3-glykosidisch verbundenen Einheiten von 1,4-glykosidisch verknüpfter β-D-Galactopyranose und 3,6-Anhydro-α-L-Galactopyranose [65]. Das lineare Molekül zeigt wenig Interaktion mit Molekülen wie Nukleinsäuren und Proteinen. Wird die Agarose geschmolzen, verflechten sich beim Abkühlen die langen unverzweigten Moleküle zu Helices, die wiederum ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Die Porengröße wird hauptsächlich durch die Menge gelöster Agarose bestimmt (z.B. 1 % [w/v] Agarose  $\triangleq$  150 nm) [64]. Im Agarosegel können ohne Spezialprotokolle DNA-Fragmente mit einer Größe von 25 kBp bis 80 bp aufgetrennt werden [1].

Die Färbung der DNA im Agarosegel kann über verschiedene Farbstoffe, die in die DNA interkalieren, erfolgen. Der verbreiteteste dabei ist Ethidiumbromid, es können allerdings auch z.B. SYBR Green oder Metylenblau eingesetzt werden [1]. In dieser Arbeit wurde der

kommerziell erhältliche Farbstoff GelRed™ verwendet, der in der Regel vor dem Aufkochen der Agarose zugegeben wurde.

### **3.4. Chemische Sensoren**

Der Begriff des Sensors findet seit den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts eine zunehmende Verbreitung. Im Allgemeinen versteht man darunter einen Rezeptor (Messfühler), der mit der Umwelt in direktem Kontakt steht, und einen Transduktor (Wandler), der das primäre Signal in elektrische Signale umwandelt [66]. Sensoren sollen in direktem Kontakt mit den zu untersuchenden Objekten stehen, nichtelektrische Informationen in elektrische Signale umwandeln, schnell ansprechen und möglichst kontinuierlich operieren sowie klein und preisgünstig sein [66].

Im Gegensatz zum allgemeinen Sensorbegriff gibt es für den Begriff des chemischen Sensors eine offizielle Definition der IUPAC [67], die übersetzt folgendermaßen lautet:

„Ein chemischer Sensor ist eine Anordnung, die chemische Informationen (diese reichen von der Konzentration eines einzelnen Probenbestandteils bis zur Gesamtanalyse der Zusammensetzung) in ein analytisch nutzbares Signal umwandelt. Die erwähnten chemischen Informationen können von einer chemischen Reaktion der Probe oder von einer physikalischen Eigenschaft des untersuchten Systems herrühren.“

Chemische Sensoren können anhand des Operationsprinzips des Transduktors oder ihres Anwendungsgebietes weiter unterteilt werden. Einen Spezialfall stellen dabei die auch in dieser Arbeit verwendeten elektrochemischen Biosensoren dar. Diese definieren sich übersetzt wie folgt: „Ein elektrochemischer Biosensor ...nutzt ein biologisches Erkennungselement (einen biologischen Rezeptor), der in direktem räumlichen Kontakt mit einem elektrochemischen Transduktorelement steht.“ [68]

Dieser biologische Rezeptor kann aus Enzymen, Antikörpern, DNA oder Mikroorganismen bestehen [69]. Der Transduktor übersetzt die biochemische Primärreaktion in ein optisches oder elektrisches Signal. Der wohl am weitesten verbreitete elektrochemische Biosensor ist der Glucose-Sensor von Clark [70], bei dem das Enzym Glucose-Oxidase auf einer Sauerstoff-

Elektrode immobilisiert ist und die Umsetzung der Glucose entweder durch den verbrauchten Sauerstoff oder das gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektiert wird [69].

### 3.4.1. Hybridisierungssensoren

Eine Spezialisierung des Biosensors stellt der Hybridisierungssensor dar, der von der IUPAC in einem technischen Report ausführlich beschrieben wird [71]. Bei diesem stellt in der Regel ssDNA [72-74] oder ein Oligonukleotid, in dem Guanosin durch Inosin ersetzt wurde [75-77], die immobilisierte Sonde dar. Die Immobilisierung kann durch Einlagerung der Sonde in eine Polymermatrix [78] oder durch kovalente Bindung modifizierter Oligonukleotide an eine modifizierte Elektrode [31, 79-81] erfolgen. Eine Variante der Modifizierung ist in Abbildung 4 dargestellt. Dabei wird ein Anilinderivat zunächst diazoniert. Dieses kann dann elektrochemisch in ein Aryl-Radikal reduziert werden, das an die Elektrode bindet. Die Carboxylgruppe der Arylgruppe wird dann in einem zweiten Schritt durch 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-1-Carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert, so dass im letzten Schritt ein mit einer Aminogruppe modifiziertes Oligonukleotid kovalent an die modifizierte Elektrode gebunden werden kann.

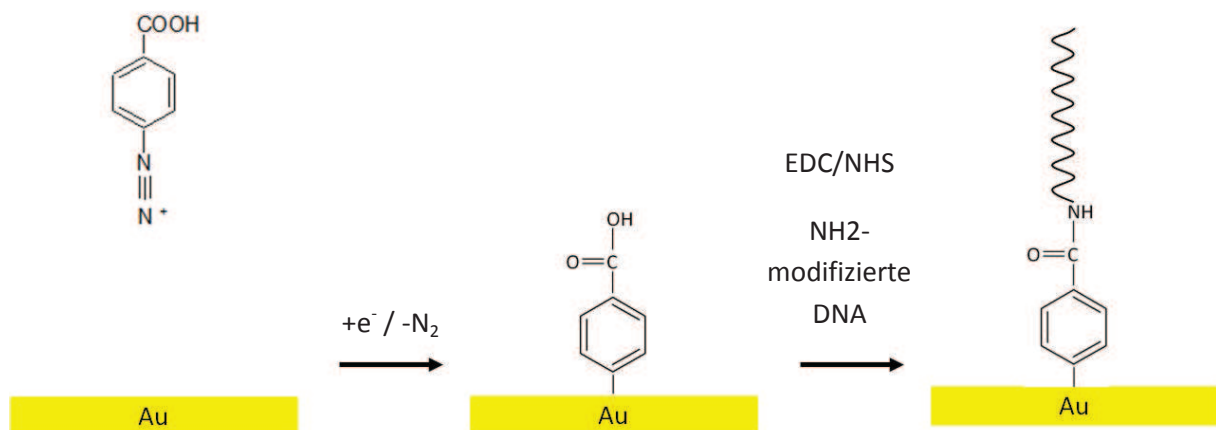


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Modifizierung einer Goldelektrode mittels Diazoniumsalz, modifiziert nach [81]

Eine andere Möglichkeit der Sondenimmobilisierung ist die Ausbildung einer Self-Assembled Monolayer (SAM) der Sonden auf dem Elektrodenmaterial [72, 82-85], wie sie für eine Variante in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist. Dabei wird in einem ersten Schritt die in diesem Fall mit einem Thiol-Linker modifizierte Sonde auf der Elektrodenoberfläche



immobilisiert. Die noch verbliebene freie Fläche wird in einem zweiten Schritt mittels z.B. Mercaptohexanol verschlossen. Dabei werden dann auch die Sonden von der Elektrodenoberfläche aufgerichtet. Danach kann im letzten Schritt mit der so modifizierten Elektrode zwischen komplementären und nicht-komplementären DNA-Targets unterschieden werden.

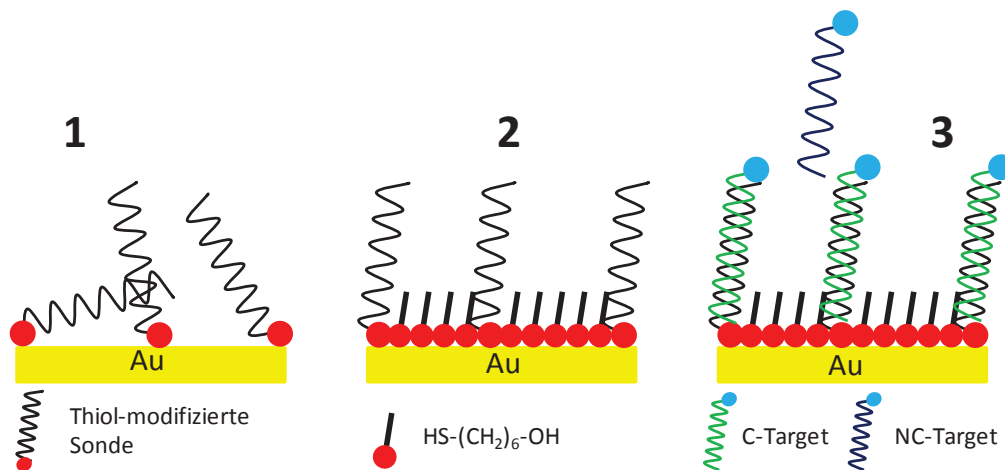


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Modifizierung einer Goldelektrode mit einer SAM  
1. Immobilisierung der Sonde; 2. Nachbelegung mit Mercaptohexanol; 3. Sequenz-spezifische Hybridisierung mit dem Target

## 3.5. Elektrochemische Methoden

### 3.5.1. Zyklische Voltammetrie (CV)

Die zyklische Voltammetrie ist eine Technik, die sehr verbreitet ist, wenn es darum geht, qualitative Informationen über elektrochemische Reaktionen zu erhalten [86-88]. Dabei wird das an die Arbeitselektrode angelegte Potential über eine gewisse Zeit dreiecksförmig von einer Anfangsspannung  $E_1$  zu einer Umkehrspannung  $E_2$  erhöht und dann wieder zur Anfangsspannung gesenkt. Das Ergebnis dieses Potentialverlaufs wird als Strom-Potential-Diagramm aufgenommen. Diesem kann man Aussagen über die für die Analyten charakteristischen Oxidations- und Reduktionspotentiale entnehmen und daher Informationen über die Thermodynamik von Redoxsystem erhalten. Des Weiteren gibt die CV Auskunft über die Kinetik heterogener Elektronentransferprozesse, sowie über angeschlossene Reaktionen und Adsorptionsprozesse an der Elektrode [88]. Man kann die Potentialzyklen dabei beliebig oft wiederholen. In Abbildung 6 ist ein typisches zyklisches

Voltammogramm dargestellt, das mit dem Redoxsystem  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  in einem wässrigen Elektrolyten erhalten wurde. Die gemessenen Ströme werden durch die Faraday'schen Ströme verursacht, die durch die Oxidation bzw. die Reduktion der Analyten an der Elektrode entstehen [89].

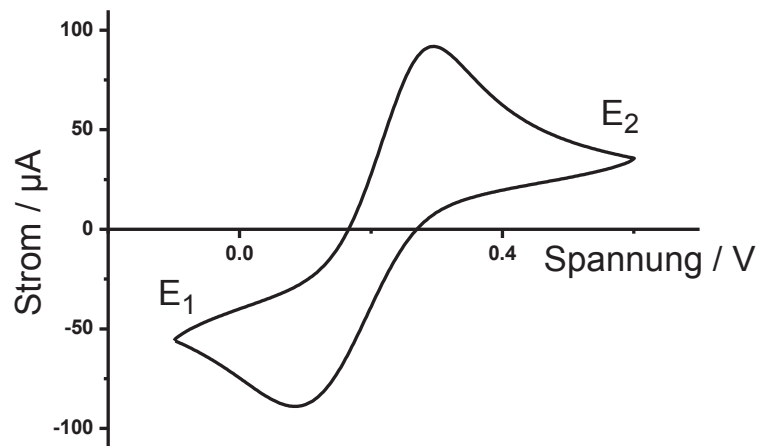


Abbildung 6: Zyklisches Voltammogramm des Redoxsystems  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  in wässrigem Elektrolyten

In der vorliegenden Arbeit wurde die zyklische Voltammetrie zum Reinigen der Elektroden [90] und zur Qualitätskontrolle der Elektroden verwendet.

### 3.5.2. Square-Wave Voltammetrie (SWV)

Bei der SWV wird eine treppenförmig oder linear ansteigende Spannung von einem rechteckförmigen Wechsellspannungspuls überlagert. Die Strommessung erfolgt jeweils am Ende des positiven und des negativen Pulses, wie es in Abbildung 7 dargestellt ist. Es wird die Stromdifferenz zwischen beiden Messungen berechnet und gegen die Spannung im Diagramm aufgetragen, wodurch sich eine peakförmige Strom-Spannungs-Kurve ergibt, die überwiegend den Faraday'schen Strom repräsentiert [89]. Die Peakhöhe ist dadurch proportional zur Analytenkonzentration. Diese Methode ist nicht nur durch die Differenzbestimmung relativ empfindlich, sie bietet darüber hinaus noch den Vorteil, dass eine Messung sehr schnell durchgeführt werden kann und die verwendeten Elektroden damit nur geringen Belastungen ausgesetzt sind [89]. Des Weiteren bietet die

Geschwindigkeit der Methode die Möglichkeit, sie zur Messung in Fließsystemen oder für Kinetikstudien einzusetzen [88].

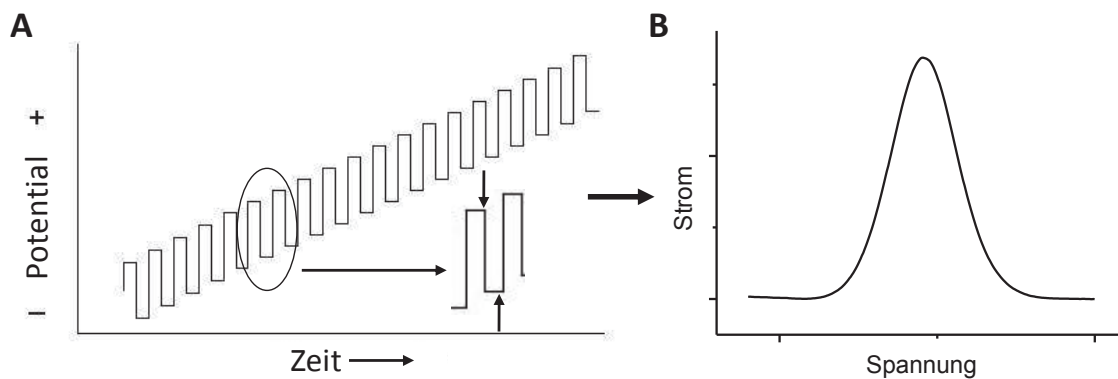


Abbildung 7: Spannungs-Zeit-Funktion (A) und Strom-Spannungs-Kurve der SWV (B)

(A) modifiziert nach: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Squarewave\\_Potential\\_Sweep.JPG](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Squarewave_Potential_Sweep.JPG), vom 04.02.2013

### 3.6. Elektrochemische Detektionsmethoden für DNA (Pub. 1)

Für die Detektion von DNA gibt es neben den klassischen molekularbiologischen Methoden, wie Southern Blot [42], Microarray-Analyse [44] und Sequenzierung [91] auch die Möglichkeit der elektrochemischen Detektion. Dieses Feld der Analyse hat im Verlauf der letzten 20 Jahre stark an Bedeutung zugenommen, wie die steigende Anzahl an Veröffentlichungen in diesem Feld belegt. Dabei wird zunächst häufig mit künstlichen Oligonukleotiden gearbeitet, erst danach erfolgt unter Umständen eine Übertragung der entwickelten Methoden auf Realproben. Dieser Aspekt wurde in der Publikation 1 der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet. Der Experimentator muss bei der Arbeit mit Realproben verschiedene Hürden bewältigen. Zum Einen stellt in der Regel die gesuchte DNA-Sequenz nur einen sehr kleinen Teil der Gesamt-DNA dar. Häufig wird diese dann mittels PCR vervielfältigt, um spezifische Signale zu erhalten. Zum Anderen ist der Einfluss von Matrixelementen wie Enzymrückständen oder Pufferkomponenten zu berücksichtigen. Die Detektion der DNA kann mittels verschiedener Methoden erfolgen.

### 3.6.1. Detektion von unmarkierter DNA

Eine der Varianten der elektrochemischen Detektion von DNA ist die Detektion unmarkierter DNA. Paleček hat bereits 1958 und 1960 nachgewiesen, dass DNA elektrochemisch aktiv ist und mittels oszillographischer Polarographie an der Quecksilbertropfelektrode nachgewiesen werden kann [7, 8]. Da insbesondere das Guanin unter gängigen elektrochemischen Untersuchungsbedingungen elektrochemisch aktiv ist, kann dieses Signal zum indirekten Nachweis der DNA dienen. Eine Form der unspezifischen Detektion von DNA wurde von Tencaliec *et al.* gezeigt [92]. Dabei wurde Kälberthymus-DNA auf einer Elektrode abgeschieden und die Guanosin-Oxidation detektiert. Verschiedene toxische Substanzen wurden mit der so modifizierten Elektrode in Kontakt gebracht und der Abfall des Guanosin-Signals beobachtet, wodurch Rückschlüsse auf den Grad der DNA-Schädigung gezogen werden konnten. Der Nachweis von sequenzspezifischer DNA-Hybridisierung gelang Wang *et al.* mit einer an eine Inosin-haltige Sonde komplementär hybridisierten DNA [93, 94]. Diese Variante des Nachweises wurde von Wangs Arbeitsgruppe durch den Einsatz biotinylierter Fängersonden noch optimiert [95]. Dabei wurde das gesuchte Target mit diesen Sonden hybridisiert. Die Reinigung und Konzentration des Komplexes erfolgte mittels Streptavidin-überzogener „Magnetic Beads“. Der Komplex wurde dann von den Beads gelöst und aufgespalten und es erfolgte die Bindung des Targets an die Inosin-haltige Sonde, wo der Nachweis erfolgen konnte. Auch die Arbeitsgruppe um Ozsoz nutzte Inosin-haltige Sonden auf verschiedenen Kohleelektroden zum sequenzspezifischen Nachweis von DNA [75-77, 96]. Eine weitere Methode wurde von Mohan *et al.* beschrieben [97]. Dabei wurde die Hybridisierung von einer ssDNA-Sonde, die an einer Glaskohlelektrode immobilisiert war, mit verschiedenen ssDNA-Targets mittels Impedanz-Spektrographie ermittelt. Es konnte ein Target mit einer Fehlpaarung (mismatch) von einem vollständig komplementären Target unterschieden werden. Auch Wu *et al.* nutzten die markierungsfreie Detektion zum sequenzspezifischen Nachweis von DNA [98]. Bei dieser Methode wurden Sonden an goldbeschichtete Graphitelektroden gebunden. Die Messung erfolgte mittels stromloser Potentiometrie. Es ergaben sich nach Hybridisierung mit den verschiedenen Targets (1 mismatch, 3 mismatches, komplementäres Target) unterschiedliche Potentiale. Diese wurden zur Bestimmung der Hybridisierung herangezogen. Auch mittels elektrochemischer Impedanzspektroskopie (EIS) kann DNA markierungsfrei detektiert werden [78, 99]. Dies wurde unter anderem von Corrigan *et al.* beschrieben [27]. Ihnen gelang damit der Nachweis

von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Isolaten. Es wurden doppelsträngige PCR-Produkte mittels  $\lambda$ -Exonuklease-Behandlung in ssDNA umgesetzt, deren Detektion mit EIS erfolgte. Auch Zhou *et al.* nutzten die EIS zum elektrochemischen Nachweis von sequenzspezifischer DNA [29]. Dabei verstärkten sie das Signal durch einen „Super-Sandwich Assay“. Das Target war so konstruiert, dass es einerseits an eine immobilisierte Fängersonde und andererseits am anderen Ende eine weitere Fängersonde binden konnte, an die dann wieder weitere Targets komplementär hybridisierten. Eine andere Variante der Verstärkung von EIS-Signalen wurde von Zhu *et al.* präsentiert [100]. Sie nutzen Kohle-Nanoröhrchen zur Verbesserung der Anlagerung von Sonden auf die Elektrodenoberfläche. Chen *et al.* zeigten auf, dass mittels EIS auch die Konformationsänderung der DNA (flexible ssDNA gegenüber starrer dsDNA), nachgewiesen werden kann [101]. Verschiedene Aspekte der elektrischen Grenzschichten für die markierungsfreie Detektion von DNA wurden von Gebala und Schuhmann rezensiert [25]. Wenn Realproben analysiert werden sollen, bei denen die Targets mittels PCR amplifiziert werden, dann besteht darüber hinaus die Möglichkeit, die Abnahme der Konzentration an freien Desoxyguanosintriphosphaten (dGTP) in der PCR-Lösung zu detektieren [102]. Dabei wird allerdings auf den sequenzspezifischen Nachweis verzichtet.

### **3.6.2. Detektion von markierter DNA**

Neben den verschiedenen Varianten der Detektion von unmarkierter DNA gibt es auch die Möglichkeit, die Hybridisierung mittels elektrochemisch aktiver Marker zu detektieren. Diese können dabei nach erfolgreicher Hybridisierung mittels ionischer Bindung oder Interkalation in die dsDNA die erfolgte Hybridisierung von Sonde und Target nachweisen. Daneben kann die Markierung auch mittels kovalent gebundener Marker erfolgen. Es kann sowohl das Target als auch die Sonde markiert sein.

#### ***3.6.2.1. Markierung durch Interkalation oder ionische Bindung***

Ein weit verbreiteter Interkalator für die Detektion von sequenzspezifischer DNA in der Elektrochemie ist Methylenblau (MB) [82, 103-110], das in einer reversiblen Redoxreaktion zum Leukomethylenblau reduziert werden kann [66], wie es in Abbildung 8 dargestellt ist.

Die verschiedenen Varianten der Interkalation und Anlagerung und die daraus resultierenden Signale wurden von Farjami et al. untersucht [111]. In Experimenten mit unterschiedlich langen ssDNA-Haarnadel-Sequenzen fanden sie heraus, dass das MB-Signal von der Länge der DNA-Sequenz und von der Anwesenheit von GC-Paarungen in der Duplex-Struktur abhängt. So ist das MB-Signal bei einer 27 Nukleotide langen ssDNA-Haarnadel-Struktur höher als bei der korrespondierenden dsDNA, während es bei einer 20 Nukleotide langen ssDNA-Haarnadel-Struktur niedriger gegenüber der entsprechenden dsDNA ist.

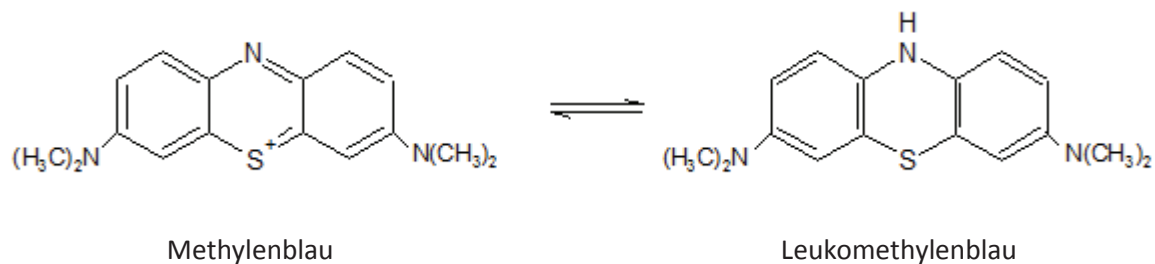


Abbildung 8: Redoxreaktion von Methylenblau bei pH >6

MB wurde auch von Erdem *et al.* eingesetzt, um *Microcystis* spp. an Kohlepastelektroden zu detektieren [112]. Sie konnten dabei zwischen komplementären, 1-Basen-mismatch- und 2-Basen-mismatch-Targets unterscheiden. Das Methylenblau-Signal war dabei umso kleiner, je effektiver die Hybridisierung zwischen Sonde und Target war, da sich MB besser an ssDNA als in dsDNA anlagert [113]. Des Weiteren nutzten Marques *et al.* MB als elektrochemisch aktiven Indikator zum Nachweis von DNA [114]. Sie verwendeten CV und Chronocoulometrie (CC), um Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in Realproben zu detektieren. Dabei wurde die erfolgreiche Hybridisierung des gesuchten Targets mit einer auf der Elektrode immobilisierten Sonde mittels CV nachgewiesen, die Allel-Zusammensetzung der SNPs wurde mittels CC nachgewiesen.

Eine Markierung durch Anlagerung an das negativ geladene Rückgrat der DNA wurde von Fang *et al.* beschrieben [115]. Bei dieser Methode wurde eine PNA-Sonde auf der Elektrode immobilisiert und mit einem DNA-Target hybridisiert. Die Markierung erfolgte mit einem Ferrocen-enthaltenden kationischen Polythiophen, das sich über ionische Bindungen an die DNA anlagert. Ähnliches wurde auch von Hejazi *et al.* beschrieben [116], wobei hier mit MB als Indikator gearbeitet wurde.

Weitere Interkalatoren, die für den Nachweis von sequenzspezifischer DNA eingesetzt wurden, sind zum Beispiel ein Luteolin-Kupfer-Komplex [117], Di(1,10-phenanthrolin)(Imidazo[*f*]1,10-phenanthroline)cobalt(II) [31], Hoechst 33258 [118, 119], Anthrachinon Monosulfonsäure (AQMS) [74], Acridinorange [120], Proflavin [121] oder Daunomycin [122]. Eine Zwischenform zwischen Markierung durch Interkalatoren und kovalente Bindung von elektrochemisch aktiven Substanzen wurde von Won *et al.* vorgestellt [123]. Sie wiesen in Realproben *Chlamydia trachomatis* durch CC nach. Die Detektion erfolgte mittels eines Anthrachinon-Biotin-Komplexes, der mit dem Anthrachinon-Teil in die DNA interkaliert, während der Biotin-Teil von einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex kovalent gebunden wird. Das Enzym oxidiert 4-Chloronaphthol unter Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ein unlösliches Produkt, welches sich auf der Elektrodenoberfläche ablagert.

### **3.6.2.2. Markierung durch kovalente Bindung**

Die kovalente Bindung von elektrochemisch aktiven Markierungen an die DNA hat für die spätere Detektion verschiedene Vorteile. Zum Einen ist neben der Hybridisierung von Sonde und Target kein weiterer Reaktionsschritt nötig, in dem die elektrochemisch aktive Markierung mit der DNA reagiert. Zum Anderen erhält man nur dann ein Signal, wenn tatsächlich eine komplementäre Basenpaarung zwischen Sonde und Target stattgefunden hat, während bei Interkalatoren häufig auch schon die ssDNA-Sonde ein Signal ergibt [112]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie der elektrochemisch aktive Marker in die Reaktion eingeführt werden kann. Entweder ist das Target markiert [124, 125] oder es wird mit einer markierten Sonde gearbeitet, die mit dem auf der Elektrode immobilisierten Target hybridisiert [126] bzw. die neben der auf der Elektrode immobilisierten Fänger-Sonde zusätzlich am Target bindet [35]. Darüber hinaus gibt es auch die Möglichkeit, einen an die Sonde gebundenen Signalstrang zu verdrängen [36] oder dem unmarkierten Target markiertes Target beizumischen und dieses Gemisch einem kompetitiven Bindungs-Assay an der Elektrode auszusetzen [127]. In beiden Fällen sinkt das elektrochemische Signal, wenn komplementäres Target in der Hybridisierungslösung vorhanden ist.

Die Markierung des Targets kann über eine Biotinylierung erfolgen, wie es von Wang *et al.* beschrieben wurde. An die biotinylierten Targets wurden Streptavidin-überzogene Goldnanopartikel gebunden [128], an die dann noch Silber angelagert wurde [129]. Die

Targets wurden mit den an Magnetic Beads gebundenen Sonden hybridisiert, über die dann auch die Reinigung des Sonden-Targets-Komplexes erfolgte. Die Gold- oder Silbermarkierung wurde mittels inverser Voltammetrie detektiert. Ähnliches wurde von Yeung *et al.* beschrieben, wobei sie mittels asymmetrischer PCR amplifizierte Targets nachwiesen [130]. Weitere Einsatzmöglichkeiten von Magnetic Beads für die elektrochemische Detektion von DNA wurden darüber hinaus von Paleček und Fojta rezensiert [131]. Auch Schüler *et al.* beschrieben Biotin-markierte Targets [132]. Allerdings erfolgte die Detektion in diesem Fall durch die Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes an die Biotin-Markierung, durch dessen Enzymaktivität Silbernanopartikel zwischen Mikroelektroden gebildet wurden. Die erhöhte Leitfähigkeit diente als Nachweis der komplementären Basenpaarung zwischen Target und Sonde. Der Einbau der Biotin-Markierung, an die Streptavidin-Enzym-Komplexe binden, deren Enzymaktivität für die Nachweisreaktion der Hybridisierung verantwortlich ist, kann auch während der Herstellung der Targets mittels PCR erfolgen. Dabei kann sowohl der Primer biotinyliert sein [33], als auch biotinyliertes dCTP während der PCR ins Target eingebaut werden [133]. Bütow und Lisdat beschrieben die parallele Detektion zweier Targets auf einer Elektrode, die mit zwei verschiedenen Sonden belegt war [124]. Die Targets waren kovalent mit Ferrocen bzw. Methylenblau markiert, die Detektion von parallel hybridisierten Targets an die Sonden erfolgte mittels Differential Puls Voltammetrie (DPV). Eine weitere Methode der Markierung von Targets wurde von Silvestri *et al.* dargestellt [134]. Sie demonstrieren die direkte Markierung der Target-DNA mit Glucoseoxidase, deren Aktivität durch Umsetzung eines Redoxmediators detektierbar ist. Auch die in unserer Arbeitsgruppe verwendete Markierung mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  stellt eine kovalente Bindung dar [10], wie es in Abbildung 9 dargestellt ist, da der Osmat(VI)ester unter Oxidation des Pyrimidinrings gebildet wird.

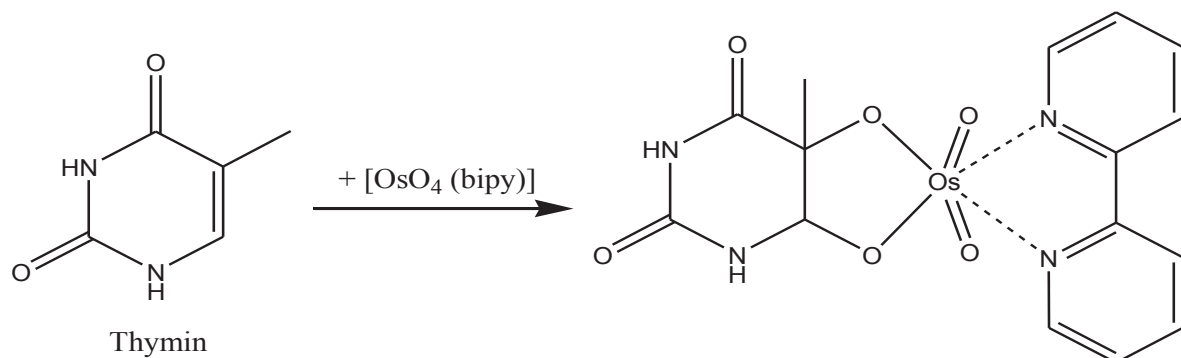


Abbildung 9: Darstellung der Reaktion von Osmiumtetroxidbipyridin mit der Base Thymin nach [10]



Dabei wird zunächst die gesuchte Sequenz des Targets mittels eines teilkomplementären Schutzstrangs geschützt, dann erfolgt die Markierung mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ . Die Hybridisierung von immobilisierter Sonde und Target erfolgt unter Verdrängung des Schutzstrangs [38, 39]. Diese Form der Markierung ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

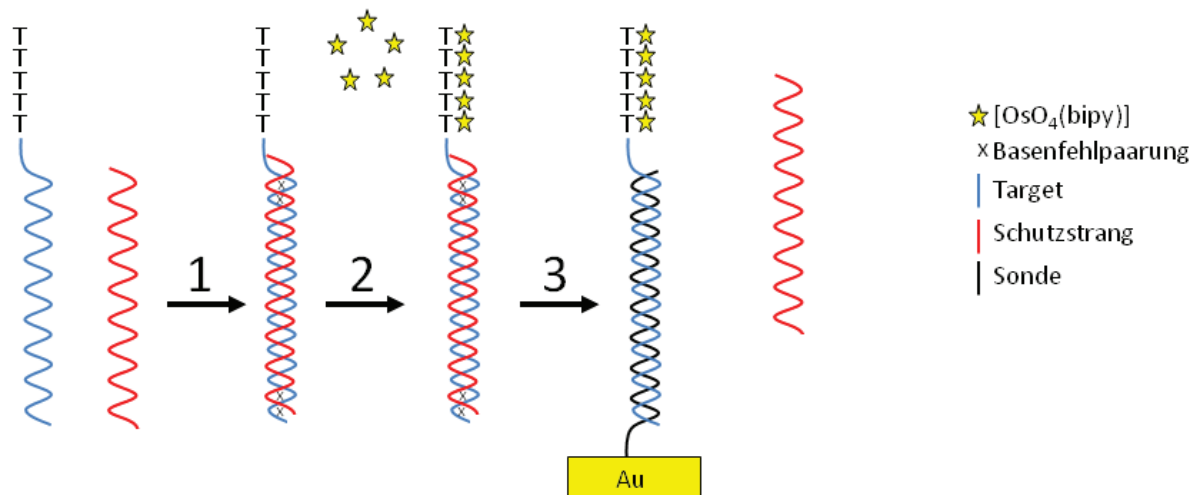


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Markierung von DNA mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  und der Detektion an der Goldelektrode

1. Hybridisierung von Target und Schutzstrang, 2. Markierung mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ , 3. Hybridisierung des Targets an die komplementäre Sonde unter Verdrängung des Schutzstrangs

Mittels dieser Markierung gelang nicht nur der sequenzspezifische Nachweis von DNA an geheizten Elektroden [125] oder, wie in den Publikationen zur vorliegenden Arbeit beschrieben, in geheizter Lösung sondern auch der nicht-sequenzspezifische Nachweis von tRNA [135]. Lermo et al. bewiesen den Nachweis von PCR-Produkten [136]. Die PCR erfolgte dabei mit einem biotinylierten und einem DIG-markierten Primer. Die Biotin-Markierung diente der Immobilisierung auf Streptavidin-überzogenen Magnetic Beads, an die DIG-Markierung wurde ein Anti-DIG-Enzym-Komplex gebunden. Dieser katalysierte die Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Hydrochinon als Mediator, was mittels Chronoamperometrie nachgewiesen werden konnte.

Neben dem Target kann auch die Sonde markiert werden. So beschrieb die Arbeitsgruppe um Sun die Markierung der Sonde mit PbS- und CdS-Nanopartikel [137-139]. Dabei wurden die unmarkierten Targets immobilisiert, dann erfolgte die Zugabe der Sonde. Für die Detektion wurde die Nanopartikel-Markierung in Salpetersäure gelöst und die Metallionen durch inverse Voltammetrie nachgewiesen. Bei Dong et al. [140] wurde eine ähnliche Nachweismethode beschrieben, allerdings waren die Metall-Nanopartikel hier mittels

Streptavidin-Biotin-Bindung an die biotinylierten Sonden gebunden. Die Biotinylierung der Sonde wurde auch von Pividori *et al.* [126] dargelegt. In diesem Fall wurde doppelsträngige Target-DNA an der Elektrode immobilisiert und nach Denaturierung in Einzelstränge mit einer Biotin-markierten Sonde hybridisiert. An diese band wiederum ein Streptavidin-Enzym-Komplex und die Enzymaktivität konnte mit einem redoxaktiven Substrat nachgewiesen werden. Ähnliches beschrieben auch Azek *et al.* [141]. Aguilar und Patolsky *et al.* zeigten auf, dass auch die Sonde direkt mit einem Enzym funktionalisiert werden kann [142, 143]. Ähnliches wurde auch von Zhang *et al.* dargelegt [144]. Eine weitere Methode des Nachweises von sequenzspezifischer DNA wurde von Huang *et al.* belegt [35]. Sie nutzen Biotin-markierte Fängersonden, um ein unmarkiertes Target an Streptavidin-beschichtete Kohlepastelelektroden zu binden. An dieses band eine Fluoreszin-markierte Detektorsonde, die mittels eines Komplexes aus einem Antikörper gegen Fluoreszin und einer Peroxidase, die das Substrat K-Blau umsetzt, amperometrisch nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Möglichkeit der elektrochemischen DNA-Detektion wurde von Ferguson *et al.* aufgezeigt [145]. Sie nutzen eine MB-markierte Sonde, die ohne vorhandenes Target in der Lösung eine Haarnadelstruktur ausbildet und damit das MB in direkte Nähe zur Elektrode bringt, was zu einem hohen Basissignal führte. Sobald komplementäres Target in der Lösung vorhanden war, bildete sich zwischen Sonde und Target ein Doppelstrang aus, wodurch das MB weiter von der Elektrode entfernt war, was zu einem Signalabfall führte.

Eine Kombination der kovalenten Markierung von Target oder Sonde führten Fojta *et al.* ein [146, 147]. Sie markierten das Target mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ , um es dann mit einer biotinylierten Sonde zu hybridisieren. Es wurden die Signale beider elektrochemisch aktiven Substanzen gemessen und ins Verhältnis gesetzt. Dieser Wert gab Aufschluss über die Anzahl der gesuchten DNA-Triplets.

Eine weniger gängige Methode des elektrochemischen DNA-Nachweises wurde von Duwensee *et al.* beschrieben [36]. Sie verwendeten ein mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  markiertes Signaloligonukleotid, das an der Fängersonde gebunden vorlag. Kam es zu einer Hybridisierung mit einem unmarkierten Target, wurde das Signaloligonukleotid verdrängt, das voltammetrische Signal nahm ab. Ein ähnliches Prinzip der kompetitiven Bindung wurde auch von Pänke *et al.* gezeigt [127]. Sie gaben dem nicht-markierten Target eine definierte Menge von Methylenblau-markiertem Target hinzu. Je höher der Anteil des unmarkierten

Targets war, desto stärker nahm das Hybridisierungssignal, verglichen mit einem Experiment mit nur markiertem Target, ab.

Es ist zu beobachten, dass bei der kovalenten Markierung Biotin am weitesten verbreitet zu sein scheint. Dieses hat den Vorteil, dass Nachweisreagenzien, wie Streptavidin-überzogene Magnetic Beads und Streptavidin-Enzym-Komplexe, kommerziell erhältlich sind und damit dem Experimentator viele Möglichkeiten offen halten.

Des Weiteren ist festzuhalten, dass bei der Arbeit mit Realproben i.d.R. das gesuchte Target mittels PCR amplifiziert werden muss. Nur in Ausnahmefällen kann bisher darauf verzichtet werden. Dies gilt im Wesentlichen dann, wenn die gesuchte Sequenz ohnehin in einer hohen Anzahl in der Probe vorliegt, wie das bei bestimmten rRNA-Spezies der Fall ist [148] oder auch bei sogenannter Satelliten-DNA vorkommt [149].

Insgesamt muss festgestellt werden, dass sich trotz der steigenden Zahl an Publikationen auf dem Gebiet der elektrochemischen DNA-Detektion nur ein geringer Anteil mit Realproben befasst, da verschiedene Matrixelemente der Proben und ein hoher Anteil an unspezifischer DNA das Arbeiten mit Realproben deutlich gegenüber künstlicher Oligonukleotide komplizieren.

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Publikationen beschäftigen sich mit der elektrochemischen Detektion von DNA in Realproben bzw. mit der Markierung verschiedener DNA-Sequenzen gleichzeitig. Gemeinsam ist ihnen, dass sie verschiedene Schritte auf dem Weg zu einem elektrochemischen DNA-Array darstellen, in dem mehrere DNA-Sequenzen gleichzeitig elektrochemisch analysiert werden können. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels werden die einzelnen Schritte anhand der Publikationen näher erläutert.

### **4.1. Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten – Herstellung der Einzelstränge mittels Exonuklease (Pub. 2)**

Bei der elektrochemischen Markierung und Detektion eines PCR-amplifizierten Targets stellte sich das Problem, dass die doppelsträngigen PCR-Produkte für die verwendete Markierung in ssDNA überführt werden müssen [150]. Dafür wurde einer der Primer mit einer Phosphat-Gruppe am 5'-Ende modifiziert. Mittels dieser Modifizierung wurde der Abbau dieses Stranges der DNA durch die  $\lambda$ -Exonuklease ermöglicht [151], wie es in Abbildung 11 schematisch dargestellt ist. Dabei zeigten Untersuchungen der DNA im Agarosegel, dass der Abbau der DNA nicht vollständig war (Pub. 2, Fig. 1). Für die weiterführenden Untersuchungen konnte diese Tatsache allerdings vernachlässigt werden. Die  $\lambda$ -Exonuklease wurde nach der Reaktion thermisch inaktiviert und die DNA gereinigt. Die so erhaltene ssDNA wurde mittels der in der Arbeitsgruppe Flechsig entwickelten Schutzstrang-Methode elektrochemisch markiert. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die Hybridisierungstemperatur bei der elektrochemischen Detektion von Oligonukleotiden sowohl an geheizten Elektroden [125] als auch in geheizten Bulklösungen [39] eine wesentliche Rolle spielt. Daher wurde auch hier der Einfluss dieses Faktors untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Steigerung der Hybridisierungstemperatur von Raumtemperatur auf 50 °C bereits nach nur 8 min eine Verdreifachung der Signalhöhe zur Folge hatte. Bei einer Temperatur von 50 °C war die auf der Elektrode immobilisierte Sondenschicht bereits nach 30 min gesättigt und die maximale

Hybridisierungseffizienz damit erreicht, längere Hybridisierungszeiten wirkten sich sogar eher negativ auf die erreichten Signale aus. Bei Raumtemperatur erreichten die Hybridisierungssignale selbst nach 60 min nicht die Höhe wie die bei 50 °C nach 8 min (Pub. 2, Fig. 4).

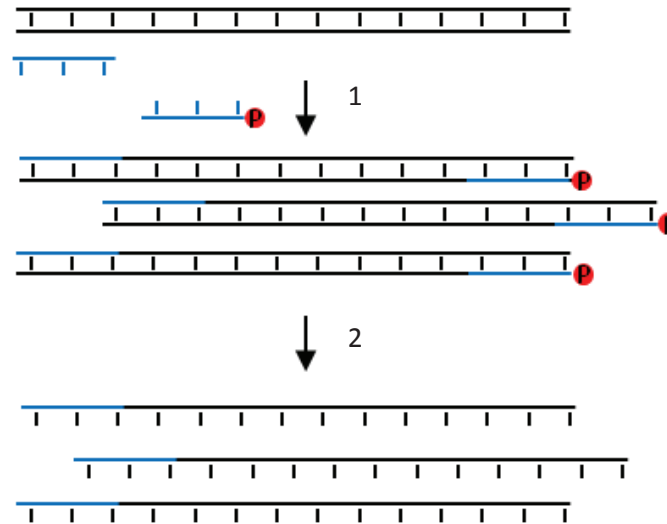


Abbildung 11: Schematische Darstellung des  $\lambda$ -Exonuklease-Abbaus

Schritt 1: PCR mit einem phosphorylierten und einem unmarkierten Primer, das Ergebnis ist dsDNA, deren einer Strang am 5'-Ende phosphoryliert ist; Schritt 2:  $\lambda$ -Exonuklease-Behandlung, es verbleibt ssDNA

Der Temperaturverlauf der Hybridisierungen verlief sigmoidal, wobei sich die Hybridisierungssignale von 25-35 °C und die von 50-60 °C kaum voneinander unterschieden (Pub. 2, Fig. 3). Im niedrigen Temperaturbereich von 25-35 °C ist davon auszugehen, dass die Hybridisierungseffizienz mit der Sonde durch Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb des langen und überwiegend einzelsträngigen Targets sowie der Sonde gehemmt ist. Im hohen Temperaturbereich von 50-60 °C ist es möglich, dass positive Effekte der Temperatur auf die Hybridisierungseffizienz durch negative Effekte der Temperatur auf die Stabilität der Sonden-SAM auf der Elektrode eliminiert werden. Die Sondenschicht wurde dabei in allen dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten mit der in Kapitel 3.4.1. und Abbildung 5 beschriebenen Methode hergestellt. Der stets verwendete Linker für die Immobilisierung der Sonde an der Goldelektrode ist in der Abbildung 12 dargestellt. Durch Reduktion seiner drei Disulfidbrücken stehen sechs Thiolgruppen für eine stabile Bindung der Sonde an die Goldelektrode zur Verfügung.

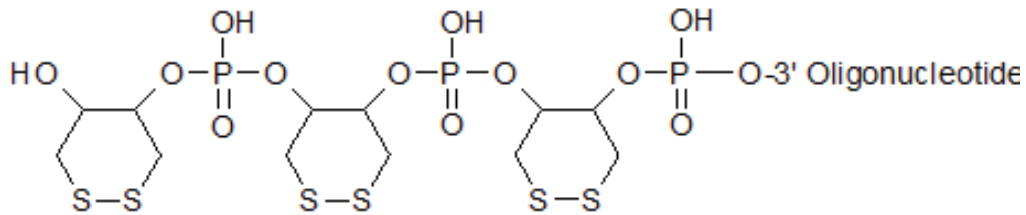


Abbildung 12: 3x 3'-Disulfid- Linker der Firma Friz Biotech GmbH

Es konnte also mit diesen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Schutzstrang-Methode nicht nur für die Markierung von Oligonukleotiden eingesetzt, sondern auch bei der Markierung PCR-amplifizierter Targets angewendet werden kann. Darüber hinaus wurde der Vorteil der Temperaturoptimierung der Hybridisierungsreaktion herausgestellt. Nachteilig bei dieser Methode ist der Einsatz der  $\lambda$ -Exonuklease zur Gewinnung von ssDNA. Einerseits stellt das Enzym einen weiteren Kostenfaktor dar, der für den langfristigen Einsatz der elektrochemischen Detektion in DNA-Arrays nachteilig ist. Andererseits werden dadurch weitere Arbeitsschritte ( $\lambda$ -Exonuklease-Behandlung und anschließende Reinigung der DNA vom Enzym und den Abbauprodukten der DNA) notwendig, die die eigentlich schnelle und unkomplizierte Detektion konterkarieren.

#### 4.2. Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten - Herstellung der Einzelstränge mittels asymmetrischer PCR (Pub. 3)

Während die Herstellung von ssDNA mit der unter Kapitel 4.1. beschriebenen Methode zusätzlich zur PCR eine weitere Enzymbehandlung und einen zusätzlichen Reinigungsschritt erfordert, ermöglicht die asymmetrische PCR eine direkte Amplifikation von ssDNA. Dafür wurde einer der beiden Primer im Überschuss zugesetzt, die PCR-Produkte waren daher dsDNA und ssDNA. Dabei wurde die ssDNA nur linear vermehrt [48] und nicht, wie bei der PCR üblich, exponentiell. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in diesem Fall direkt für die Markierung eingesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass die Bestandteile der PCR-Lösung die nachfolgenden Reaktionen nicht wesentlich stören würden. Die untersuchten Sequenzen entsprachen im Wesentlichen denen aus Kapitel 4.1. (Pub.2), allerdings wurde der Schutzstrang dahingehend modifiziert, dass die mismatches keine Thyminreste in der

Targetsequenz betrafen, und bei der Markierung der Negativkontrolle wurde ein NC-Schutzstrang eingesetzt. Es wurden der Einfluss von Temperatur und Hybridisierungszeit auf die Hybridisierungseffizienz untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C auch nach 60 min Hybridisierungszeit keine Sättigung der Sonden-SAM auf der Elektrode erreicht wird (Pub. 3, Fig. 3), was deutlich von den in Kapitel 4.1 (Pub. 2) gezeigten Ergebnissen abweicht, denn bei dem Einsatz von mit  $\lambda$ -Exonuklease hergestellten einzelsträngigen Targets wurde eine Sättigung der SAM bereits nach 30 min beobachtet, eine längere Hybridisierungszeit erzielte keine höheren Signale. Es ist zu vermuten, dass die geringere Hybridisierungseffizienz beim Einsatz von mit asymmetrischer PCR hergestellten Targets zum Einen auf einer möglicherweise geringeren Konzentration des einzelsträngigen Targets beruht und zum Anderen auf störende Effekte, verursacht durch die ebenfalls in der Lösung vorhandene dsDNA, zurückzuführen ist. Beide Varianten können auch für insgesamt niedrigere Hybridisierungssignale verantwortlich gemacht werden. So war nach 15 min Hybridisierungszeit das Signal bei 50 °C Hybridisierungstemperatur nur ungefähr doppelt so hoch wie bei Raumtemperatur (Pub. 3, Fig. 3), während es bei Targets, die mit  $\lambda$ -Exonuklease-Behandlung hergestellt wurden, unter gleichen Bedingungen etwa dreimal so hoch war (Pub. 2, Fig. 4). Auch der Temperaturverlauf zeigte bei der Verwendung des mit asymmetrischer PCR hergestellten Targets keinen sigmoidalen Verlauf. Hier war ein eindeutiges Maximum bei 50 °C erkennbar, während ab 55 °C die Signale wieder abfielen (Pub. 3, Fig. 4). Dies kann ebenso wie die insgesamt niedrigeren Signale auf sterische Hinderungen durch die dsDNA bzw. auch auf Anlagerungen durch möglicherweise aufgeschmolzene, nicht markierte DNA zurückgeführt werden.

Da bei den in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten die Negativkontrolle während des Markierungsprozesses mit einem NC-Schutzstrang behandelt wurde, war während der Markierung ein Teil der Zielsequenz zumindest temporär geschützt. Es konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierungssignale der Negativkontrolle deutlich höher waren als beim Einsatz der mit  $\lambda$ -Exonuklease behandelten Targets, wo auf einen Schutzstrang verzichtet wurde (Kap. 4.1., Pub. 2). Dies wurde besonders bei 23 °C deutlich. Das Signal der Negativkontrolle betrug noch ungefähr 50 % des Signals des Targets mit normalem Schutzstrang. Auch bei 50 °C war das Signal mit dem normalen Schutzstrang nur etwa 17 Mal so hoch wie bei der Negativkontrolle mit dem NC-Schutzstrang (Pub. 3, Fig. 2). Bei dem mit  $\lambda$ -Exonuklease behandelten Target stand ein etwa 50 Mal höheres Signal bei 50 °C

gegenüber der Hybridisierung mit dem ohne Schutzstrang markierten Target (Pub. 2, Fig. 2). Der Unterschied zwischen Target und Negativkontrolle war also wesentlich deutlicher herausgestellt. Hier wurde zusätzlich noch einmal nachgewiesen, dass zum Einen ein vollständig mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  markierter DNA-Strang nicht mehr zur Hybridisierung mit seinem komplementärem Strang in der Lage ist und zum Anderen, dass auch ein überwiegend NC-Schutzstrang bei einer Markierung bei RT fähig ist, die Zielsequenz zumindest temporär zu schützen.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Herstellung der Targets mittels asymmetrischer PCR möglich ist und der Einsatz dieser Targets in der Markierung und Detektion ohne weitere Reinigungsschritte durchgeführt werden kann. Damit ist mit dieser Methode ein wesentlicher Kosten- und Zeitfaktor gegenüber der in Kapitel 4.1. vorgestellten Methode reduziert worden.

### **4.3. Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten – Herstellung der Einzelstränge mittels konvektiver PCR (Pub. 4)**

Nachdem durch die in Kapitel 4.2. dargestellten Untersuchungen (Pub. 3) nachgewiesen werden konnte, dass die Herstellung einzelsträngiger Targets mittels asymmetrischer PCR erfolgen kann, wurde dieser Ansatz weiter verfolgt. Allerdings wurde die PCR in diesem Fall nicht in einem Thermocycler durchgeführt, sondern es wurde auf das Prinzip der konvektiven PCR zurückgegriffen [152]. Dabei wird die PCR-Lösung punktuell so weit erhitzt, dass zum Einen an dieser Stelle die DNA denaturiert wird und sich zum Anderen um diese Stelle herum eine konvektive Strömung einstellt. Dieses Prinzip wurde auch von der Arbeitsgruppe um Braun verfolgt, wobei sie auf ein in die PCR-Lösung eingetauchtes Heizelement [153] oder eine extern punktuell geheizte PCR-Kammer zurückgriffen, um die Konvektion der PCR-Lösung zu gewährleisten. In unseren Experimenten wurde ein PCR-Reaktionsgefäß (PCR-Eppi) mit einem direkt heizbaren Platindraht versehen und die Temperaturkalibrierung der so entstandenen Drahtelektrode wie bereits beschrieben durchgeführt [154]. Der elektrotechnische Aufbau für die Heizkalibrierung ist in Abbildung



13B zu sehen, in der Abbildung 13A ist der generelle Aufbau des verwendeten PCR-Eppis dargestellt.

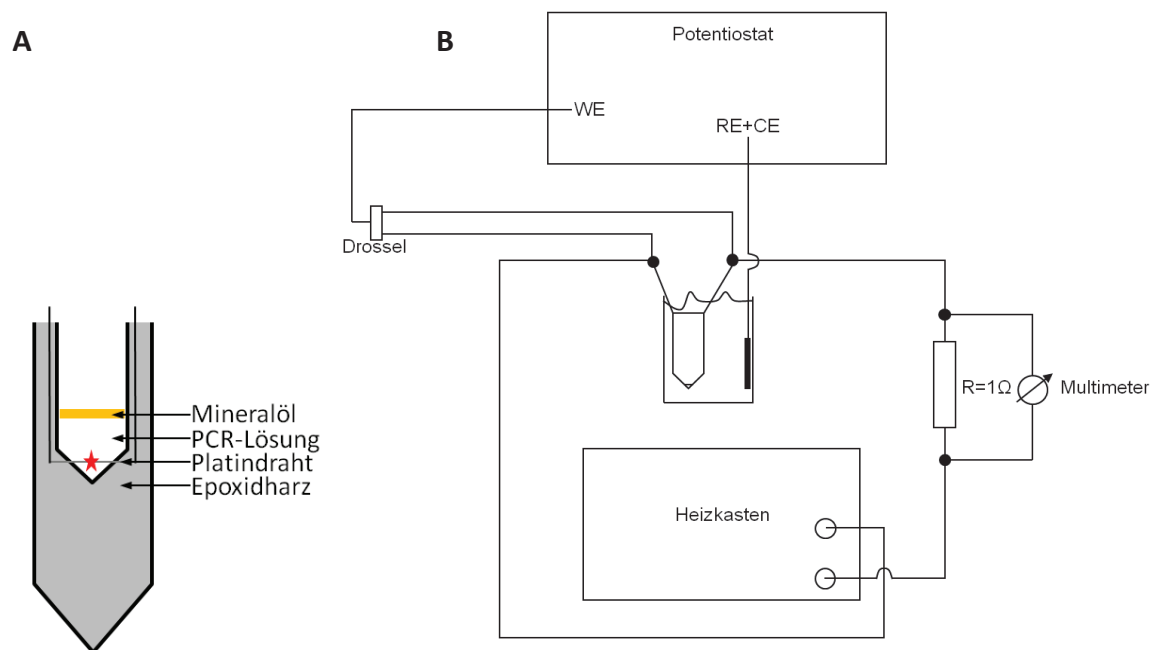


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines PCR-Eppis (A) und des elektrotechnischen Aufbaus für eine Temperaturkalibrierung (B)

Dort ist auch zu sehen, dass die PCR-Lösung mit Mineralöl überschichtet werden musste, um die Verdunstung der Lösung ausschließen zu können. Für die spätere Temperierung des PCR-Eppis für die PCR wurden die in Abbildung 13B dargestellte Drossel sowie der Potentiostat entfernt. Die Temperierung der PCR-Lösung erfolgte ausschließlich durch Heizen des Drahtes auf  $89\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die weiteren Temperaturzonen, die für eine erfolgreiche PCR nötig sind, wurden durch die am Draht entstehende Konvektion erreicht, wie es in Figure 4 der Publikation 4 auch dargestellt ist. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass mit dieser Methode eine erfolgreiche symmetrische und asymmetrische PCR möglich ist. Dies wurde nicht nur mittels Gelelektrophorese der PCR-Produkte gezeigt, sondern die mittels asymmetrischer PCR amplifizierte DNA wurde auch markiert und elektrochemisch detektiert. Es zeigte sich, dass die konvektive PCR bereits nach etwa 15-30 min eine Sättigung erreichte, obwohl im Agarosegel noch nicht inkorporierte Primer sichtbar waren (Pub. 4, Fig. 1). Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der Lösung sich in sogenannten „toten Zonen“, also Zonen innerhalb der Lösung, die von der Konvektion nicht betroffen sind, abgelagert hat und damit diese Primer für die weitere PCR unzugänglich gemacht hat. Trotzdem erreichten die

elektrochemischen Signale der mit konvektiver PCR produzierten Targets etwa 50 % der Höhe der mittels konventioneller PCR amplifizierten Targets (Pub. 4, Fig. 2). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die für die PCR benötigte Zeit bei der konvektiven PCR weniger als die Hälfte gegenüber der normalen PCR betrug.

Es kann also zusammengefasst gesagt werden, dass mittels konvektiver PCR produzierte ssDNA markiert und elektrochemisch detektiert werden kann. Dieser Ansatz stellt einen wesentlichen Schritt zu einem elektrochemischen DNA-Array dar, da mittels dieser Methode die Möglichkeit besteht, DNA in einem Gefäß zu amplifizieren und diese, z.B. bei Einbau eines weiteren Drahtes als Arbeitselektrode, auch zu detektieren. Dafür wäre es lediglich nötig, die Sonde mit einem markierten Signaloligonukleotid zu hybridisieren, das dann von den nicht-markierten Targets verdrängt wird, oder einen der Primer elektrochemisch zu markieren und damit das PCR-Produkt direkt elektrochemisch detektierbar zu machen.

#### **4.4. Multiple Markierung verschiedener Oligonukleotid-Targets (Pub. 5)**

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Herstellung von einzelsträngigen Targets mittels PCR für die elektrochemische Detektion beschrieben wurde, soll jetzt die multiple Markierung verschiedener Targets im Vordergrund stehen. Auch dieses stellt einen wesentlichen Meilenstein auf dem Weg zu einem elektrochemischen DNA-Array dar, da in einem solchen mit mehreren Elektroden verschiedene Sequenzen gleichzeitig analysiert werden sollen. Es bestand also ein großes Interesse daran, die Möglichkeit der multiplen Markierung mittels der verwendeten Schutzstrang-Methode zu untersuchen. Während in den vorangegangenen Untersuchungen mit PCR-amplifizierten Targets gearbeitet wurde, wurde bei diesen Experimenten wieder auf künstliche Oligonukleotide als Targets zurückgegriffen, da nicht nur neue Sequenzen analysiert, sondern auch zum ersten Mal mehrere verschiedene Sequenzen mit der Schutzstrang-Methode mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  parallel markiert werden sollten. Die Sequenzen stammen aus Mais bzw. gentechnisch verändertem Mais und wurden von unseren Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Zwei der Sequenzen ermöglichten den Nachweis von Mais und dienten damit als Positivkontrolle (SSIIB weist das Stärke-Synthase-Gen nach und ivrp weist das Invertase-Gen nach) und die

zwei anderen befähigten zum Nachweis des *cryIa/b*-Transgens in Mais (CRY) und der Insertion des *cryIa/b*-Transgens an der richtigen Stelle im Maisgenom (810).

Es wurden zunächst alle Sequenzen einzeln markiert und bezüglich der Temperaturoptima der Hybridisierung analysiert. Erwartungsgemäß zeigte sich bei allen vier Sequenzen, dass eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur von Raumtemperatur auf 50 °C sowohl die Signalstärke als auch die Spezifität erhöht. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Optimierung der Hybridisierungstemperatur äußerst wichtig ist. In den Figures 1C und 1D (Pub. 5) wurde der Unterschied in den Hybridisierungssignalen zwischen ivrp und 810 bei 40 °C und 50 °C dargestellt. Dabei zeigte sich, dass bei ivrp deutlich niedrigere Signale bei 40 °C erreicht wurden als bei 810, während dieser Unterschied bei 50 °C nicht mehr nachweisbar ist. Diese Unterschiede sind sehr wahrscheinlich auf unterschiedlich stabile Sekundärstrukturen der ssDNA-Sonden zurückzuführen. Des Weiteren wurden Untersuchungen mit Mischtargets mit zwei Sequenzen durchgeführt. Dabei konnte für alle Sondensequenzen gezeigt werden, dass nur dann signifikante Hybridisierungssignale auftraten, wenn die jeweils komplementäre Target-Sequenz im Mischtarget vorhanden war. Die Signale der Negativkontrollen waren stets vernachlässigbar. Dies ist in den Figures 3A und 3B (Pub. 5) und darüber hinaus in Abbildung 14 noch einmal ausführlicher graphisch dargestellt. In Abbildung 14 sieht man außerdem, dass die Signale von einzeln markiertem Target und den Mischtargets mit zwei Sequenzen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

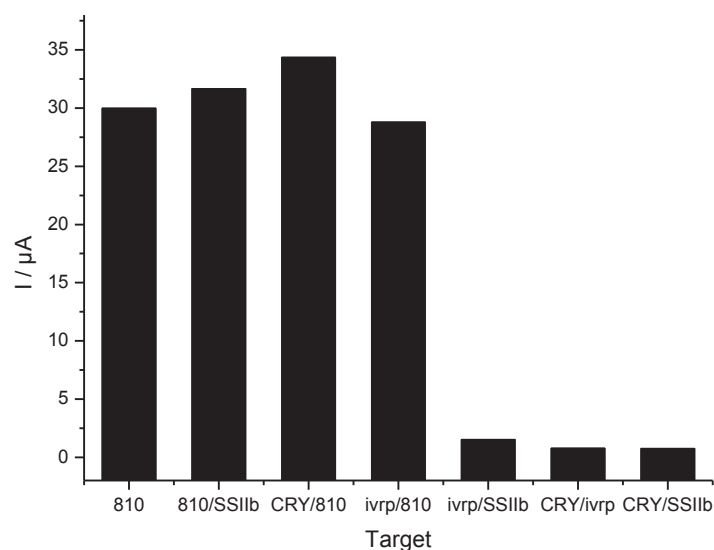


Abbildung 14: Sonde 810 mit verschiedenen Mischtargets

Messung mit SWV in Tris-Puffer (10 mM Tris, 0,5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 7,5 mit 200 Hz und 40 mV Amplitude, Hybridisierung: 50 °C, 15 min, je Target 200 nM

In der Figure 3C (Pub. 5) wurden dann die Ergebnisse der Messungen mit Mischtargets zur Diskriminierung zwischen Sequenzen von Mais und gentechnisch verändertem Mais dargestellt. Dabei wurde die Detektion auf Mais mit einem Mischtarget mit den Sequenzen ivrp und SSIIb durchgeführt, während die Detektion auf gentechnisch veränderten Mais mit einem Mischtarget aus den Sequenzen ivrp, SSIIb, 810 und CRY durchgeführt wurde. Beide Mischtargets wurden jeweils mit allen vier Sonden hybridisiert. Man kann sehen, dass die Sonden CRY und 810 nur bei den Mischtargets, die die Sequenzen für die gentechnische Veränderung beinhalteten, Signale erzeugten, während mit den Sonden für Mais (ivrp und SSIIb) bei beiden Targets Hybridisierungssignale erzielt werden konnten. Dabei fiel allerdings auf, dass die Signale mit dem vier-Sequenzen-Mischtarget gegenüber dem mit nur zwei Sequenzen um fast 50 % reduziert waren. Entweder ist die Hybridisierungseffizienz bei diesem aufgrund der nichtkomplementären DNA reduziert, oder der Grund für die niedrigeren Signale ist bereits in der geringeren Markierungseffizienz der Targets zu suchen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit diesen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, dass verschiedene Sequenzen parallel in einem Ansatz markiert werden können. Zum Teil kommt es dabei zu einem Verlust der Hybridisierungseffizienz, allerdings war es trotzdem noch möglich, mit künstlichen Targets zwischen Sequenzen von Mais und gentechnisch verändertem Mais zu differenzieren.

#### **4.5. Nachweis kleiner Mengen von gentechnisch verändertem Mais in Maismehlproben (Pub. 6)**

Nachdem der Nachweis von Mais und gentechnisch verändertem Mais mittels künstlicher, parallel markierter Oligonukleotide gezeigt werden konnte (Kap. 4.4.), sollten Targets mit diesen Sequenzen mit asymmetrischer PCR hergestellt werden. Die dazu nötige DNA als Template für die PCR wurde aus Maismehlproben, die uns von unseren Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Dies stellte eine weitere Neuerung dar, da bisher synthetische ssDNA als Template in der PCR eingesetzt wurde.

Die Targets für die ersten Experimente mit diesen Realproben wurden mit 100 % isogener oder transgener DNA als Template für die PCR hergestellt und die Hybridisierungen zwischen

markiertem Target und auf der Elektrode immobilisierter Sonde bei 50 °C durchgeführt. Dabei zeigte sich bei allen Sequenzen ein zeitabhängiger Anstieg der Hybridisierungssignale, wie es in den Figures 1A (Sequenz ivrp, Targetlänge: 104 b) und 1B (810, 92 b) (Pub. 6) sowie in der Abbildung 15 (A: SSIIb, 151 b; B: CRY, 113 b) dargestellt ist. Es wurde darüber hinaus in allen Diagrammen deutlich, dass keine Signale erzielt werden konnten, wenn bei der asymmetrischen PCR der falsche Primer im Überschuss eingesetzt wurde, so dass NC-Targets entstanden, die im Zuge des Markierungsprozesses darüber hinaus nicht geschützt wurden. Des Weiteren fiel auf, dass die Signale generell deutlich niedriger waren als bei den künstlichen Targets. Dies ist aber wahrscheinlich hauptsächlich auf die deutlich geringere Targetkonzentration zurückzuführen.

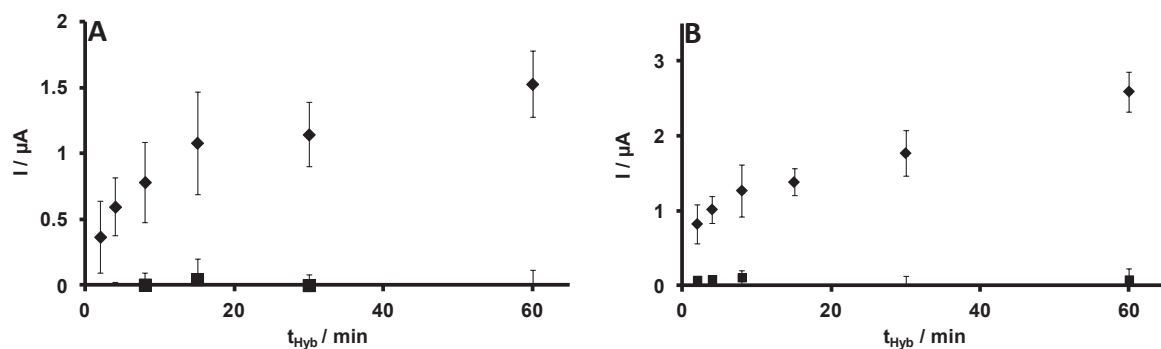


Abbildung 15: Einfluss der Hybridisierungszeit auf die SWV-Signale

(A) Sonde SSIIb mit komplementärem (C-) Target (Rauten) und nicht-komplementärem (NC-) Target (Quadrate); (B): Sonde CRY mit C-Target (Rauten) und NC-Target (Quadrate), SWV mit 200 Hz, 40 mV Amplitude, Hybridisierungstemperatur 50 °C

Darüber hinaus wurde die PCR von 810 und CRY mit isogener DNA als Template durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass keine Hybridisierungssignale mit diesen Targets erhalten wurden, wie es für die Sequenz CRY in Abbildung 16 dargestellt ist. Wurde allerdings die gleiche PCR mit transgener DNA als Template durchgeführt, konnten Hybridisierungssignale erzielt werden (Inlay von Abbildung 16). In Kapitel 4.4. konnte die besondere Bedeutung der optimalen Hybridisierungstemperatur am Beispiel der Sequenzen ivrp und 810 gezeigt werden. Dabei war ein Anstieg von 40 °C auf 50 °C ausreichend, um die deutlich niedrigeren Hybridisierungssignale von ivrp denen von 810 anzupassen. Daher wurde in den Untersuchungen mit den Realproben der Frage nachgegangen, ob dieser Effekt auch bei Herstellung der Targets mittels asymmetrischer PCR nachzuweisen ist.

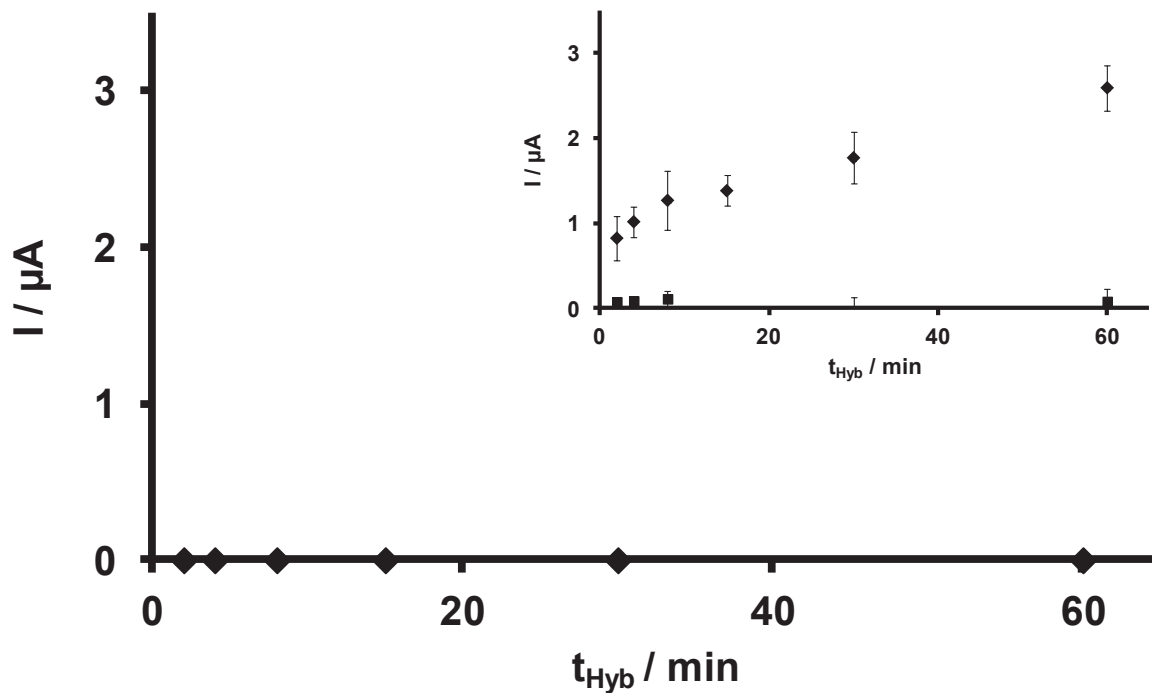


Abbildung 16: Hybridisierungssignale der Sequenz CRY

SWV mit 200 Hz, 40 mV Amplitude, Hybridisierungstemperatur 50 °C, große Graphik: PCR mit isogener DNA als Template, Inlay: PCR mit transgener DNA als Template

Es konnte gezeigt werden, dass dieser sogar stärker ausgeprägt ist als bei den Experimenten mit den künstlichen Targets, wie es in Figure 1C (Pub. 6) gezeigt ist. Darüber hinaus lagen die Hybridisierungssignale von 810 auch bei 50 °C deutlich höher als die von ivrp. Hier ist wahrscheinlich nicht nur die Ausbildung von Sekundärstrukturen in der Sonde ivrp für die generell niedrigeren Signale verantwortlich, sondern zusätzlich werden auch stärkere Sekundärstrukturen im einzelsträngigen Bereich des Targets ivrp ausgebildet.

Die bisher vorgestellten Erkenntnisse wurden mit 100 % isogener bzw. transgener DNA als Template der PCR erhalten. Da innerhalb der Europäischen Union der Grenzwert für transgenen Mais innerhalb konventionellen Maises bei 0,9 % liegt, wurde versucht, diese geringen Spuren und weniger auch mit der elektrochemischen Nachweismethode zu detektieren. Dafür wurden die isogenen Maismehlproben mit entsprechenden Mengen des transgenen Maismehls versetzt und die DNA daraus isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass auch mit dieser Methode der Detektion 0,9 % an transgenem Mais nach einer vier- bis achtminütigen Hybridisierungszeit in den Proben nachgewiesen werden konnten. Für

geringere Konzentrationen erscheint eine Hybridisierungszeit von mindestens 30 min. nötig, um die Existenz der transgenen Sequenzen signifikant zu belegen (Pub. 6, Fig. 2).

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass mit diesen Ergebnissen nachgewiesen werden konnte, dass mit der von Flechsig und Reske [39] etablierten Methode der Hybridisierung von Targetsträngen mit einem Schutzstrang und anschließender Markierung mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  nicht nur mittels PCR amplifizierte Targets generell nachgewiesen werden können. Es ist darüber hinaus auch möglich, Targets zu detektieren, bei denen die PCR mit genomischer DNA, isoliert aus Realproben, als Template durchgeführt wurde, auch wenn nur ein kleiner Teil (unter 1 % [w/w]) der gesamten genomischen DNA die entsprechende Template-Sequenz enthielt. Diese Untersuchungen stellen damit einen weiteren Schritt auf dem Weg zu elektrochemischen DNA-Arrays für Realproben dar.

#### **4.6. Verfahren zur sequenzspezifischen Detektion von Nukleinsäuren (Pub. 7)**

Parallel zu den bisher beschriebenen Untersuchungen wurde überlegt, wie die Herstellung der ssDNA zur Markierung mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  schneller und effizienter durchgeführt werden könnte. Die Herstellung mittels symmetrischer PCR mit einem phosphorylierten Primer und anschließendem  $\lambda$ -Exonuklease-Abbau hat den Vorteil, dass die DNA während der PCR exponentiell amplifiziert wird, jedoch den Nachteil, dass ein weiterer Enzym-haltiger Reaktionsschritt sowie die nachfolgende Reinigung die gesamte Reaktionszeit deutlich verlängert und das gesamte Experiment darüber hinaus auch verteuert. Die ebenfalls verwendete asymmetrische PCR hat diese Nachteile zwar nicht, da mit den erhaltenen Einzelsträngen ohne weitere Reinigung die Markierungs- und Hybridisierungsreaktionen durchgeführt werden können, jedoch ist die Ausbeute an PCR-amplifizierten Targets geringer, da hier die Amplifikation nur linear stattfindet [48].

In der Literatur sind verschiedene Methoden der elektrochemischen DNA-Detektion bekannt, bei denen die dsDNA-Targets vor der Hybridisierung mit Fänger- oder Reportersonden thermisch denaturiert werden [147, 155, 156]. Erste Versuche, diese Methode auch auf unsere elektrochemische Markierung und nachfolgende

Nachweisreaktion anzuwenden, erbrachten keine positiven Ergebnisse [157]. In den der Patentschrift (Pub. 7) zugrunde liegenden Untersuchungen wurde ein Verfahren entwickelt, das die Anwendung der thermischen Denaturierung von PCR-Produkten auch für unsere Markierungsmethode ermöglicht.

Da bekannt ist, dass kurze Oligonukleotide schneller mit ssDNA reagieren können als die entsprechenden komplementären Stränge (Prinzip der Primeranlagerung bei der PCR), sollte es möglich sein, thermisch denaturierte DNA mittels der Schutzstrangmethode und anschließender Reaktion mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  zu markieren [38, 39]. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer zehnmütigen Denaturierung bei mindestens 95 °C und anschließender abrupter Abkühlung durch Inkubation für zehn Minuten in einer Kältemischung mit NaCl (was die Temperatur der Kältemischung auf etwa -2 - -3 °C reduziert) die Hybridisierungssignale gegenüber vorherigen Experimenten, durchgeführt nach der Methode von Reske [157], verdoppelt werden konnten.

Erfindungsgemäß kann diese Methode auch für weitere PCR-amplifizierte Sequenzen oder auch für die Markierung von mRNA oder rRNA eingesetzt werden. Bei Letzteren dient die thermische Denaturierung im Wesentlichen dem Aufbrechen von Sekundärstrukturen. Diese gesuchten Sequenzen können dann wieder mit Schutzsträngen geschützt werden. Die einzelsträngigen Abschnitte der RNA werden mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  markiert, die Schutzstränge dann analog der bekannten Methode von einer an der Elektrode immobilisierten Sonde verdrängt. Damit kann die Amplifikation der gesuchten Sequenzen mittels PCR oder RT-PCR möglicherweise entfallen. Allerdings ist bei der Arbeit mit RNA zu beachten, dass alle Geräte und Lösungen entweder doppelt autoklaviert oder mit RNase-ExitusPlus™ bzw. RNase AWAY™ behandelt werden, um weitestgehend RNase-Freiheit zu garantieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die hier vorgestellte Methode die Vorzüge von symmetrischer PCR (exponentielle Amplifikation der PCR-Produkte) und asymmetrischer PCR (kein weiteres Enzym und zusätzliche Reinigung der Reaktionslösung nötig) vereinigt. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich möglich, bei ausgewählten Sequenzen sowie der Analyse von RNA ganz auf die PCR zu verzichten und trotzdem eine sehr hohe Sensitivität zu erhalten.



## 5. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die elektrochemische Detektion von PCR-amplifiziertem, mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  markiertem Target möglich ist. Dabei ist es unerheblich, ob die für die verwendete Markierung benötigten Einzelstränge mittels asymmetrischer PCR oder enzymatischem Abbau des komplementären Stranges hergestellt werden. Allerdings bietet die asymmetrische PCR den Vorteil, dass gegenüber dem enzymatischen Abbau eines Stranges auf einen Enzym-haltigen Schritt und einen nachfolgenden Reinigungsschritt verzichtet werden kann, was sich sowohl kosten- als auch zeitsparend auf die Nachweismethode auswirkt.

Als Template für die asymmetrische PCR wurde sowohl synthetische ssDNA als auch chromosomale DNA, die aus Maismehlproben isoliert wurde, eingesetzt. Es wurde dabei zum ersten Mal gezeigt, dass die von Flechsig und Reske [38, 39] entwickelte Methode der  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -Markierung mit Schutzstrang auch für den elektrochemischen Nachweis von DNA in Realproben eingesetzt werden kann. Es konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass nicht nur 100 % transgene bzw. isogene Mais-DNA als Template in der PCR dienen konnte, sondern auch noch mit Konzentrationen von unter 1 % transgener DNA der Nachweis der gesuchten Transgene durchgeführt werden konnte.

Des Weiteren konnte erstmals gezeigt werden, dass die asymmetrische PCR, nicht nur in einem Thermocycler sondern auch an einem geheizten Draht durchgeführt, zu elektrochemisch detektierbaren Targets führt. Die erhaltenen Signale bei am Draht generierten Targets sind zwar kleiner als bei der klassischen asymmetrischen PCR, allerdings ist die benötigte Reaktionszeit deutlich kürzer als bei der PCR im Thermocycler. Diese einfache Art der Amplifikation von DNA bietet die Möglichkeit zur Konstruktion eines elektrochemischen DNA-Arrays, in dem sowohl Amplifikation als auch Detektion von DNA stattfinden können.

Darüber hinaus wurde beschrieben, dass vier, bei der Detektion von transgenem Mais interessierende, Sequenzen parallel markiert werden können. Dieser erstmalige Ansatz einer vielfachen, gleichzeitigen Markierung mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  wurde mit künstlichen Oligonukleotiden durchgeführt.

Abschließend wurde eine neue Variante der Herstellung von DNA-Einzelsträngen für die Markierung mit [OsO<sub>4</sub>(bipy)] vorgestellt. Dabei wird die DNA zunächst mit hoher Temperatur denaturiert und nachfolgend rapide in einem Eisbad abgekühlt. Die mit dieser Methode hergestellten Targets konnten elektrochemisch nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird die Verwendbarkeit dieser Methode für den Nachweis von chromosomaler DNA und RNA ohne vorangegangene Amplifikation mittels PCR oder RT-PCR postuliert. Bei allen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Optimierung der Hybridisierungstemperatur für die elektrochemische Detektion von DNA eine wesentliche Rolle spielt. Beim Vergleich von PCR amplifizierten Targets gegenüber Oligonukleotid-Targets zeigte sich, dass dieser Faktor sogar noch an Bedeutung gewinnt.

## 6. Ausblick

Die Ergebnisse aus den Publikationen der vorliegenden Arbeit stellen Grundlagen für die Entwicklung eines elektrochemischen DNA-Arrays dar, auf dem mehrere Proben parallel amplifiziert und analysiert werden sollen. Dabei können beispielsweise die Detektion von gentechnisch verändertem Mais oder die Untersuchung von Krankheiten, bei denen verschiedene Gensequenzen für die Diagnose zu beachten sind, Anwendungsgebiete für solche DNA-Arrays sein.

Dabei ist es wesentlich, dass zunächst verschiedene Sequenzen parallel amplifiziert werden können, wie es auch in der klinischen Diagnostik bei Krankheitserregern durchgeführt wird [158, 159]. Diese Sequenzen müssen parallel elektrochemisch markiert werden, damit sie nachfolgend detektiert werden können. Die in den vorliegenden Publikationen beschriebene Markierung nach der Amplifikation der Targets ist dabei nicht vorteilhaft, wenn die gesamte Untersuchung in einem DNA-Array erfolgen soll. Eine andere Möglichkeit der Markierung ist die Amplifikation mit markierten Primern, wie es für mit Biotin markierte Primer bereits beschrieben wurde [33]. Da bei der Markierung eines Primers mit Osmiumkomplexen ein Schutzstrang nötig ist, um die für das Annealing benötigte Sequenz zu schützen, wäre es sinnvoll, den Primer nach der Markierung mittels High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) von seinem Schutzstrang zu trennen, um eine Hemmung der Anlagerung in der PCR zu verhindern. Erste Untersuchungen dazu führten bisher bei der Trennung von Primer und Schutzstrang [160, 161] zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, da der Osmiumkomplex einen negativen Effekt auf das verwendete Säulenmaterial zu haben scheint. Die Amplifikation von Targets mit nicht vom Schutzstrang getrennten Primern war gelelektrophoretisch erfolgreich, allerdings konnten die so gewonnenen Targets bisher nicht elektrochemisch nachgewiesen werden [160]. Trotzdem sollte dieser Ansatz weiterverfolgt werden. Eine weitere Möglichkeit, die amplifizierten Targets direkt in einem DNA-Chip zu detektieren, stellt der von Duwensee et al. beschriebene Verdrängungsassay dar [36]. Dabei müssen die verschiedenen Parameter wie Elektrodenbelegung und Hybridisierung von Target und Sonde optimiert werden.

Weitere Untersuchungsansätze für elektrochemische DNA-Arrays betreffen die Elektroden selber. Wie in den bisherigen Untersuchungen sowohl zur vorliegenden Arbeit als auch in anderen Publikationen [125, 162] deutlich wurde, spielt die Hybridisierungstemperatur bei der elektrochemischen Detektion von DNA eine wesentliche Rolle. Sollen mehrere Sequenzen parallel an unterschiedlichen Elektroden auf einem DNA-Chip analysiert werden, muss der in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Heizgenerator dahingehend weiterentwickelt werden, dass es möglich ist, mehrere Elektroden parallel mit unterschiedlichen Temperaturen zu heizen. Zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche der auf einem DNA-Chip sehr kleinen Elektroden bietet sich das galvanische Abscheiden von Nanostrukturen an, das bereits in ersten Untersuchungen gute Erfolge zeigte [163].

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der angestrebten Arrays wäre der Nachweis von RNA. Die Markierung von RNA mit Osmiumkomplexen wurde bereits gezeigt [135, 164]. Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Variation der Markierung von Nukleinsäuren mit Osmiumkomplexen erscheint es möglich, z.B. in klinischen Proben oder Lebensmittelproben verschiedene Pathogene aufgrund ihrer 16S rRNA-Sequenzen ohne weitere Amplifikation nachzuweisen.

Einige der vorgestellten Überlegungen wurden bereits in einem Kooperationsprojekt zum Nachweis von Multiple-Sklerose-relevanten Sequenzen umgesetzt. Ein wesentliches Problem stellte dabei die Biokompatibilität der verwendeten Leiterplattentechnik gegenüber der Polymerase dar.

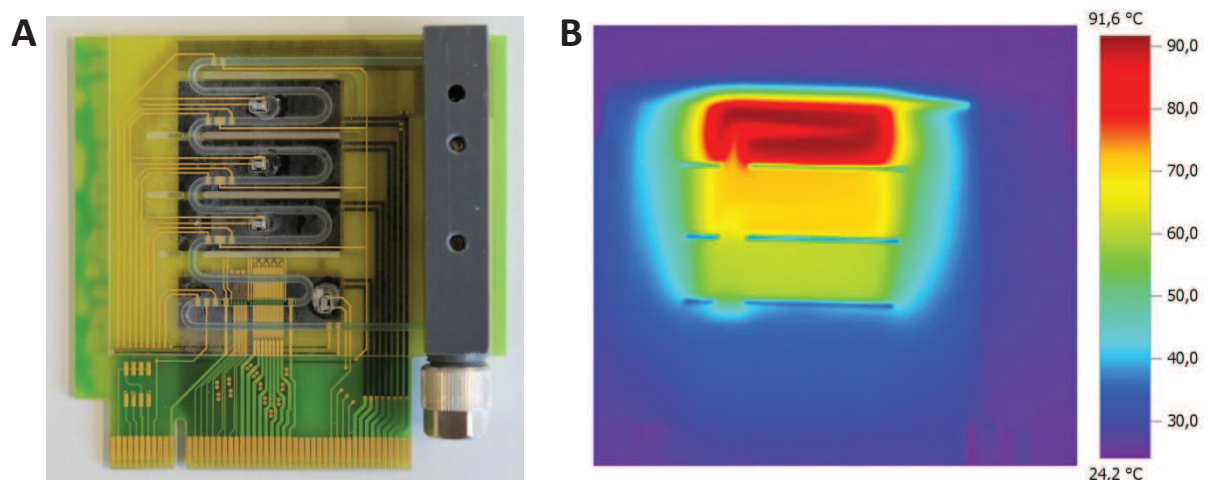


Abbildung 17: Foto des Prototyps eines DNA-Arrays (A) und seiner Wärmezonen (B) (B) mod. nach [165]

Bisher gelang die Amplifikation verschiedener Sequenzen in dem in Abbildung 16 dargestellten Fluidikchip, wobei die PCR-Lösung mittels Spritzenpumpe in die verschiedenen Wärmezonen des Chips transportiert wurde.

Auch die Detektion von Oligonukleotid-Targets konnte bisher erfolgreich ausgeführt werden. Ein weiteres Problem zeigte sich bei der Qualität der Detektionselektroden, bei denen bei Belastung häufig die darunterliegenden Nickel- und Kupferschichten elektrochemisch sichtbar wurden. Daher sind bei der Entwicklung eines elektrochemischen DNA-Arrays trotz der erfolgreichen Vorarbeiten noch weitere Optimierungen nötig, um ein zuverlässiges Instrument zu erhalten.

Daneben bietet auch die konvektive PCR weitere Möglichkeiten für eine direkte Detektion der amplifizierten Targets. Dafür wäre ein weiterer Golddraht als Arbeitselektrode im PCR-Eppi nötig, an dem die Sonde immobilisiert wird, mit der dann das amplifizierte Target hybridisieren kann. Allerdings wäre auch in diesem Fall eine Markierung direkt während der PCR oder ein Verdrängungsassay für die Detektion nötig. Auch eine Detektion mehrerer Sequenzen parallel wäre dabei analog zu den Untersuchungen von Bütow und Lisdat denkbar [124].

## 7. Literatur

- [1] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001. (Ch.12, Ch. 5.14-15, Ch. 9.77, Ch. 5.6., Ch. 5.47)
- [2] I.M. Mackay, G. Harnett, N. Jeoffreys, I. Bastian, K.S. Sriprakash, D. Siebert, T.P. Sloots, Detection and discrimination of *Herpes simplex* viruses, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and *Calymmatobacterium (Klebsiella) granulomatis* from genital ulcers, *Clin. Infect. Dis.*, 42 (2006) 1431-1438.
- [3] K.W. Loudon, J.P. Burnie, A.P. Coke, R.C. Matthews, Application Of Polymerase Chain-Reaction To Fingerprinting *Aspergillus fumigatus* By Random Amplification Of Polymorphic DNA, *J. Clin. Microbiol.*, 31 (1993) 1117-1121.
- [4] M. Piatak, K.C. Luk, J.D. Lifson, Quantitative Competitive Polymerase Chain-Reaction for Accurate Quantitation of HIV DNA and RNA Species, *BioTechniques*, 14 (1993) 70-&.
- [5] R. Reynolds, G. Sensabaugh, E. Blake, Analysis Of Genetic-Markers In Forensic DNA Samples Using The Polymerase Chain-Reaction, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2-15.
- [6] K.N. Ballantyne, R.A.H. van Oorschot, R.J. Mitchell, Increased amplification success from forensic samples with locked nucleic acids, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 5 (2011) 276-280.
- [7] E. Palecek, Oszillographische Polarographie der Nukleinsäuren und ihrer Bestandteile, *Naturwissenschaften*, 45 (1958) 186-187.
- [8] E. Palecek, Oscillographic Polarography Of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid, *Nature*, 188 (1960) 656-657.
- [9] G.C. Glikin, M. Vojtiskova, L. Renadescalzi, E. Palecek, Osmium-Tetroxide - A New Probe for Site-Specific Distortions in Supercoiled DNAs, *Nucleic Acids Res.*, 12 (1984) 1725-1735.
- [10] E. Palecek, Probing DNA-Structure with Osmium-Tetroxide Complexes *In vitro*, *Methods Enzymol.*, 212 (1992) 139-155.
- [11] K.M. Millan, S.R. Mikkelsen, Sequence-Selective Biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2317-2323.

- [12] C. Batchelor-McAuley, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, The physicochemical aspects of DNA sensing using electrochemical methods, *Biosensors Bioelectron.*, 24 (2009) 3183-3190.
- [13] S. Cagnin, M. Caraballo, C. Guiducci, P. Martini, M. Ross, M. SantaAna, D. Danley, T. West, G. Lanfranchi, Overview of Electrochemical DNA Biosensors: New Approaches to Detect the Expression of Life, *Sensors*, 9 (2009) 3122-3148.
- [14] Y. Fang, Y. Xu, P. He, DNA Biosensors Based on Metal Nanoparticles, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 1 (2005) 276-285.
- [15] J.J. Gooding, Electrochemical DNA hybridization biosensors, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1149-1156.
- [16] K. Kerman, M. Kobayashi, E. Tamiya, Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology, *Meas. Sci. Technol.*, 15 (2004) R1-R11.
- [17] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection, *Anal. Chim. Acta*, 609 (2008) 139-159.
- [18] X. Luo, I.M. Hsing, Electrochemical techniques on sequence-specific PCR amplicon detection for point-of-care applications, *Analyst*, 134 (2009) 1957-1964.
- [19] E. Palecek, Past, present and future of nucleic acids electrochemistry, *Talanta*, 56 (2002) 809-819.
- [20] E. Palecek, Fifty Years of Nucleic Acid Electrochemistry, *Electroanalysis*, 21 (2009) 239-251.
- [21] E. Palecek, M. Bartosik, Electrochemistry of Nucleic Acids, *Chem. Rev.*, 112 (2012) 3427-3481.
- [22] A. Qureshi, W.P. Kang, J.L. Davidson, Y. Gurbuz, Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications, *Diamond Relat. Mater.*, 18 (2009) 1401-1420.
- [23] O.A. Sadik, A.O. Aluoch, A. Zhou, Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques, *Biosensors Bioelectron.*, 24 (2009) 2749-2765.

- [24] J. Wang, Electrochemical nucleic acid biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 469 (2002) 63-71.
- [25] M. Gebala, W. Schuhmann, Understanding properties of electrified interfaces as a prerequisite for label-free DNA hybridization detection, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14 (2012) 14933-14942.
- [26] W. Cai, J.R. Peck, D.W. van der Weide, R.J. Hamers, Direct electrical detection of hybridization at DNA-modified silicon surfaces, *Biosensors Bioelectron.*, 19 (2004) 1013-1019.
- [27] D.K. Corrigan, H. Schulze, G. Henihan, I. Ciani, G. Giraud, J.G. Terry, A.J. Walton, R. Pethig, P. Ghazal, J. Crain, C.J. Campbell, A.R. Mount, T.T. Bachmann, Impedimetric detection of single-stranded PCR products derived from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates, *Biosensors Bioelectron.*, 34 (2012) 178-184.
- [28] W. Nai-ying, G. Wei, H. Xu-lun, C. Zhu, X. Mao-tian, Direct electrochemical sensor for label-free DNA detection based on zero current potentiometry, *Biosensors Bioelectron.*, 39 (2013) 210-214.
- [29] L.Y. Zhou, X.Y. Zhang, G.L. Wang, X.X. Jiao, H.Q. Luo, N.B. Li, A simple and label-free electrochemical biosensor for DNA detection based on the super-sandwich assay, *Analyst*, 137 (2012) 5071-5075.
- [30] S. Aydinlik, D. Ozkan-Ariksoysal, P. Kara, A.A. Sayiner, M. Ozsoz, A nucleic acid-based electrochemical biosensor for the detection of *influenza B* virus from PCR samples using gold nanoparticle-adsorbed disposable graphite electrode and Meldola's blue as an intercalator, *Anal. Methods*, 3 (2011) 1607-1614.
- [31] S.-Y. Niu, S.-S. Zhang, L. Wang, X.-M. Li, Hybridization biosensor using di(1,10-phenanthroline) (imidazo[f]1,10-phenanthroline)cobalt(II) as electrochemical indicator for detection of human immunodeficiency virus DNA, *J. Electroanal. Chem.*, 597 (2006) 111-118.
- [32] M. Guo, Y. Li, H. Guo, X. Wu, L. Fan, Electrochemical detection of short sequences related to the *hepatitis B* virus using MB on chitosan-modified CPE, *Bioelectrochemistry*, 70 (2007) 245-249.
- [33] E. Nebling, T. Grunwald, J. Albers, P. Schafer, R. Hintsche, Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 689-696.



- [34] E. Pavlovic, R.Y. Lai, T.T. Wu, B.S. Ferguson, R. Sun, K.W. Plaxco, H.T. Soh, Microfluidic device architecture for electrochemical patterning and detection of multiple DNA sequences, *Langmuir*, 24 (2008) 1102-1107.
- [35] T.J. Huang, M.S. Liu, L.D. Knight, W.W. Grody, J.F. Miller, C.M. Ho, An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes, *Nucleic Acids Res.*, 30 (2002).
- [36] H. Duwensee, M. Jacobsen, G.-U. Flechsig, Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxide-labelled signalling strands, *Analyst*, 134 (2009) 899-903.
- [37] E. Palecek, E. Rasovska, P. Boublikova, Probing of DNA Polymorphic Structure in the Cell with Osmium-Tetroxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150 (1988) 731-738.
- [38] G.-U. Flechsig, T. Reske, Verfahren zur Markierung und Analyse von Nukleinsäuren, DE-Patent 10 2005 039 726 B3, 2005, EP-Patent 1 915 464 B1, US-Patent 8,216,446.
- [39] G.-U. Flechsig, T. Reske, Electrochemical detection of DNA hybridization by means of osmium tetroxide complexes and protective oligonucleotides, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 2125-2130.
- [40] J.D. Watson, F.H.C. Crick, Molecular Structure Of Nucleic Acids - A Structure For Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171 (1953) 737-738.
- [41] E. Chargaff, R. Lipshitz, Composition Of Mammalian Desoxyribonucleic Acids, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 3658-3661.
- [42] E.M. Southern, Detection Of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated By Gel-Electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, 98 (1975) 503-508.
- [43] P.S. Thomas, Hybridization Of Denatured RNA And Small DNA Fragments Transferred To Nitrocellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci.-Biol.*, 77 (1980) 5201-5205.
- [44] H.-J. Müller, T. Röder, *Der Experimentator Microarrays*, Spektrum Akademischer Verlag Elsevier GmbH, München, 2004. (S. 7ff, S. 54 ff)
- [45] A.M. Divne, M. Allen, A DNA microarray system for forensic SNP analysis, *Forensic Sci. Int.*, 154 (2005) 111-121.

- [46] R. Knippers, Molekulare Genetik, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997. (S. 20)
- [47] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific Enzymatic Amplification Of DNA *In vitro* - The Polymerase Chain-Reaction, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51 (1986) 263-273.
- [48] C.R. Newton, A. Graham, PCR, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1994. (S. 27-45, S. 166, S. 105)
- [49] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, Primer-Directed Enzymatic Amplification Of DNA With a Thermostable DNA-Polymerase, Science, 239 (1988) 487-491.
- [50] S.J. Scharf, G.T. Horn, H.A. Erlich, Direct Cloning and Sequence-Analysis of Enzymatically Amplified Genomic Sequences, Science, 233 (1986) 1076-1078.
- [51] J.M. Clark, Novel Non-Templated Nucleotide Addition-Reactions Catalyzed by Prokaryotic and Eucaryotic DNA-Polymerases, Nucleic Acids Res., 16 (1988) 9677-9686.
- [52] D. Marchuk, M. Drumm, A. Saulino, F.S. Collins, Construction of T-Vectors, A Rapid and General System for Direct Cloning of Unmodified PCR Products, Nucleic Acids Res., 19 (1991) 1154-1154.
- [53] H.J. Holtke, W. Ankenbauer, K. Muhlegger, R. Rein, G. Sagner, R. Seibl, T. Walter, The Digoxigenin (DIG) System for Nonradioactive Labeling and Detection of Nucleic-Acids - an Overview, Cell. Mol. Biol., 41 (1995) 883-905.
- [54] S.M. Kahn, W. Jiang, C. Borner, K. O'Driscoll, I.D. Weinstein, Construction of defined deletion mutants by thermal cycled fusion: applications to protein kinase C, Technique, 2 (1990) 27-30.
- [55] Y. Imai, Y. Matsushima, T. Sugimura, M. Terada, A Simple and Rapid Method for Generating a Deletion by PCR, Nucleic Acids Res., 19 (1991) 2785-2785.
- [56] G.J. Nuovo, F. Gallery, P. Macconnell, Detection of Amplified HPV-6 and 11-DNA in Vulvar Lesions by Hot Start PCR *insitu* Hybridization, Mod. Pathol., 5 (1992) 444-448.
- [57] J.M. Butler, Forensic DNA typing : Biology, Technology and Genetics of STR markers 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, San Diego, 2005. (S. 63 ff)

- [58] P.J. Lincoln, J. Thomson, (Editors), Forensic DNA profiling protocols, in: Methods Mol. Biol., Humana Press, Totowa, NJ, 1998.
- [59] R.M. Agudelo, F. Codony, B. Adrados, M. Fittipaldi, G. Penuela, J. Morato, Monitoring bacterial faecal contamination in waters using multiplex real-time PCR assay for *Bacteroides* spp. and faecal enterococci, *Water Sa*, 36 (2010) 127-132.
- [60] R.Y.C. Kong, S.K.Y. Lee, T.W.F. Law, S.H.W. Law, R.S.S. Wu, Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR, *Water Res.*, 36 (2002) 2802-2812.
- [61] L. Jimenez, R. Ignar, S. Smalls, P. Grech, J. Hamilton, Y. Bosko, D. English, Molecular detection of bacterial indicators in cosmetic pharmaceuticals and raw materials, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 22 (1999) 93-95.
- [62] M. Tolba, M.U. Ahmed, C. Tlili, F. Eichenseher, M.J. Loessner, M. Zourob, A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensor for the rapid detection of *Listeria* cells, *Analyst*, 137 (2012) 5749-5756.
- [63] M.A. Innis, K.B. Myambo, D.H. Gelfand, M.A.D. Brow, DNA Sequencing With *Thermus-Aquaticus* DNA-Polymerase And Direct Sequencing Of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85 (1988) 9436-9440.
- [64] G. Richter, R. Kaldenhoff, *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003. (S. 71, S. 72, S.75)
- [65] S. Arnott, A. Fulmer, W.E. Scott, I.C.M. Dea, R. Moorhouse, D.A. Rees, The agarose double helix and its function in agarose gel structure, *J. Mol. Biol.*, 90 (1974) 269-284.
- [66] P. Gründler, *Chemische Sensoren - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*, Springer Verlag, Berlin, 2004. (S. 9, S. 6, S. 204)
- [67] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Chemical Sensors Definitions And Classification, *Pure Appl. Chem.*, 63 (1991) 1247-1250.
- [68] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 71 (1999) 2333-2348.
- [69] R.D. Schmid, U. Bilitewski, Biosensoren, *Chem. unserer Zeit*, 26 (1992) 163-173.

- [70] L.C. Clark, C.A. Duggan, Implanted Electroenzymatic Glucose Sensors, *Diabetes Care*, 5 (1982) 174-180.
- [71] J. Labuda, A.M. Oliveira Brett, G. Evtugyn, M. Fojta, M. Mascini, M. Ozsoz, I. Palchetti, E. Palecek, J. Wang, Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 82 (2010) 1161-1187.
- [72] T.M. Herne, M.J. Tarlov, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 8916-8920.
- [73] S.O. Kelley, E.M. Boon, J.K. Barton, N.M. Jackson, M.G. Hill, Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucleic Acids Res.*, 27 (1999) 4830-4837.
- [74] E.L.S. Wong, J.J. Gooding, Charge transfer through DNA: A selective electrochemical DNA biosensor, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 2138-2144.
- [75] D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, K. Kerman, B. Meric, J. Hassmann, M. Ozsoz, Allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation from polymerase chain reaction amplicons based on label-free electrochemical genosensor, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5931-5936.
- [76] P. Kara, D. Ozkan, A. Erdem, K. Kerman, S. Pehlivan, F. Ozkinay, D. Unuvar, G. Itirli, M. Ozsoz, Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clin. Chim. Acta*, 336 (2003) 57-64.
- [77] D. Ozkan-Ariksoysal, B. Tezcanli, B. Kosova, M. Ozsoz, Design of electrochemical biosensor systems for the detection of specific DNA sequences in PCR-amplified nucleic acids related to the catechol-O-methyltransferase val1 08/158Met polymorphism based on intrinsic guanine signal, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 588-596.
- [78] A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Pulsed amperometric detection of DNA with an ssDNA/polypyrrole-modified electrode, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 287-293.
- [79] Z.X. Gao, Y.J. Fang, J. Ren, B. Ning, H.Z. Zhu, Y.H. He, Studies on biotin-avidin indirect conjugated technology for a piezoelectric DNA sensor, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 84 (2004) 599-606.
- [80] A. Laforgue, T. Addou, D. Belanger, Characterization of the deposition of organic molecules at the surface of gold by the electrochemical reduction of aryldiazonium cations, *Langmuir*, 21 (2005) 6855-6865.

- [81] G. Liu, T. Bocking, J.J. Gooding, Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications, *J. Electroanal. Chem.*, 600 (2007) 335-344.
- [82] M.K. Patel, P.R. Solanki, S. Khandelwal, V.V. Agrawal, S.G. Ansari, B.D. Malhotra, Self-assembled Monolayer Based Electrochemical Nucleic acid Sensor for *Vibrio cholerae* detection, *J. Phys., Conf. Ser.*, 358 (2012) 012009 (012009 pp.)-012009 (012009 pp.)012009 (012009 pp.).
- [83] G.U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, DNA hybridization detection at heated electrodes, *Langmuir*, 21 (2005) 7848-7853.
- [84] G.U. Flechsig, J. Peter, K. Voss, P. Gründler, Electrochemical DNA hybridization detection using the fluorescence quenching label dabcyI, *Electrochem. Commun.*, 7 (2005) 1059-1065.
- [85] D. Mandler, S. Kraus-Ophir, Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing, *J. Solid State Electrochem.*, 15 (2011) 1535-1558.
- [86] R. Holze, *Elektrochemisches Praktikum*, B.G.Teubner GmbH, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, 2001. (S. 99)
- [87] J. Heinze, *Cyclic Voltammetry—“Electrochemical Spectroscopy”*. *New Analytical Methods* (25), *Angewandte Chemie International Edition in English*, 23 (1984) 831-847.
- [88] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, VCH Publishers, Inc., New York, 1994. (S. S. 161, S. 41)
- [89] W. Buchberger, *Elektrochemische Analyseverfahren*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998. (S. 87-92)
- [90] D.A.J. Rand, R. Woods, A study of the dissolution of platinum, palladium, rhodium and gold electrodes in 1 m sulphuric acid by cyclic voltammetry, *J. Electroanal. Chem. Interfac.*, 35 (1972) 209-218.
- [91] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74 (1977) 5463-5467.
- [92] A.M. Tencaliec, S. Laschi, V. Magearu, M. Mascini, A comparison study between a disposable electrochemical DNA biosensor and a *Vibrio fischeri*-based luminescent sensor for the detection of toxicants in water samples, *Talanta*, 69 (2006) 365-369.

- [93] J. Wang, G. Rivas, J.R. Fernandes, J.L.L. Paz, M. Jiang, R. Waymire, Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 375 (1998) 197-203.
- [94] J. Wang, A.N. Kawde, Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Anal. Chim. Acta*, 431 (2001) 219-224.
- [95] J. Wang, A.B. Kawde, Amplified label-free electrical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 127 (2002) 383-386.
- [96] D. Ozkan-Ariksoysal, H. Karadeniz, A. Erdem, A. Sengonul, A.A. Sayiner, M. Ozsoz, Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of *hepatitis B* virus genotype on the development of lamivudine resistance, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 4908-4917.
- [97] S. Mohan, P. Nigam, S. Kundu, R. Prakash, A label-free genosensor for BRCA1 related sequence based on impedance spectroscopy, *Analyst*, 135 (2010) 2887-2893.
- [98] N.-y. Wu, W. Gao, X.-l. He, Z. Chang, M.-t. Xu, Direct electrochemical sensor for label-free DNA detection based on zero current potentiometry, *Biosensors Bioelectron.*, 39 (2013) 210-214.
- [99] Y. Zhang, T. Yang, N. Zhou, W. Zhang, K. Jiao, Nano Au/TiO<sub>2</sub> hollow microsphere membranes for the improved sensitivity of detecting specific DNA sequences related to transgenes in transgenic plants, *Sci. China Ser. B Chem.*, 51 (2008) 1066-1073.
- [100] N. Zhu, Y. Lin, P. Yu, L. Su, L. Mao, Label-free and sequence-specific DNA detection down to a picomolar level with carbon nanotubes as support for probe DNA, *Anal. Chim. Acta*, 650 (2009) 44-48.
- [101] W. Chen, Y.-H. Liu, H.-N. Li, A.-L. Liu, X.-H. Lin, Y.-Z. Chen, Ultrasensitive and facile electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor based on the conformational change of the recognition interface, *Anal. Chim. Acta*, 748 (2012) 89-94.
- [102] X. Zhang, S. Liu, K. Jiao, H. Gao, Y. Shi, Rapid and cost-effective detection of sequence-specific DNA by monitoring the electrochemical response of 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate in a PCR sample, *Analyst*, 133 (2008) 1729-1735.
- [103] F. Ahour, M.H. Pournaghi-Azar, M.S. Hejazi, An electrochemical approach for direct detection and discrimination of fully match and single base mismatch double-stranded oligonucleotides corresponding to universal region of *hepatitis C* virus, *Anal. Methods*, 4 (2012) 967-972.

- [104] J. Chen, J. Zhang, K. Wang, X. Lin, L. Huang, G. Chen, Electrochemical Biosensor for Detection of BCR/ABL Fusion Gene Using Locked Nucleic Acids on 4-Aminobenzenesulfonic Acid-Modified Glassy Carbon Electrode, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 8028-8034.
- [105] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, S. Erensoy, U.S. Akarca, M. Mascini, M. Ozsoz, Electrochemical DNA biosensor for the detection of *TT* and *Hepatitis B* virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (2002) 837-846.
- [106] M.H. Poumaghi-Azar, M.S. Hejazi, E. Alipour, Developing an electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) biosensor on the basis of human interleukine-2 gene using an electroactive label, *Anal. Chim. Acta*, 570 (2006) 144-150.
- [107] N. Wei, J. Chen, J. Zhang, K. Wang, X. Xu, J. Lin, G. Li, X. Lin, Y. Chen, An electrochemical biosensor for detection of PML/RARA fusion gene using capture probe covalently immobilized onto poly-calcon carboxylic acid modified glassy carbon electrode, *Talanta*, 78 (2009) 1227-1234.
- [108] T.S. Ramulu, R. Venu, B. Sinha, B. Lim, S.J. Jeon, S.S. Yoon, C.G. Kim, Nanowires array modified electrode for enhanced electrochemical detection of nucleic acid, *Biosensors Bioelectron.*, 40 (2013) 258-264.
- [109] W. Zhang, T. Yang, D. Huang, K. Jiao, G. Li, Synergistic effects of nano-ZnO/multi-walled carbon nanotubes/chitosan nanocomposite membrane for the sensitive detection of sequence-specific of PAT gene and PCR amplification of NOS gene, *J. Membr. Sci.*, 325 (2008) 245-251.
- [110] L. Zhu, R. Zhao, K. Wang, H. Xiang, Z. Shang, W. Sun, Electrochemical behaviors of methylene blue on DNA modified electrode and its application to the detection of PCR product from NOS sequence, *Sensors*, 8 (2008) 5649-5660.
- [111] E. Farjami, L. Clima, K.V. Gothelf, E.E. Ferapontova, DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific, *Analyst*, 135 (2010) 1443-1448.
- [112] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, D. Ozkan, P. Kara, M. Ozsoz, DNA biosensor for *Microcystis* spp. sequence detection by using methylene blue and ruthenium complex as electrochemical hybridization labels, *Turk. J. Chem.*, 26 (2002) 851-862.
- [113] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U.S. Akarca, M. Ozsoz, Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the *hepatitis B* virus, *Anal. Chim. Acta*, 422 (2000) 139-149.

- [114] L.P.J. Marques, I. Cavaco, J.P. Pinheiro, V. Ribeiro, G.N.M. Ferreira, Electrochemical DNA sensor for detection of single nucleotide polymorphisms, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41 (2003) 475-481.
- [115] B. Fang, S. Jiao, M. Li, Y. Qua, X. Jiang, Label-free electrochemical detection of DNA using ferrocene-containing cationic polythiophene and PNA probes on nanogold modified electrodes, *Biosensors Bioelectron.*, 23 (2008) 1175-1179.
- [116] M.S. Hejazi, M.H. Pournaghi-Azar, F. Ahour, Electrochemical detection of short sequences of *hepatitis C 3a* virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode, *Anal. Biochem.*, 399 (2010) 118-124.
- [117] S. Niu, B. Han, W. Cao, S. Zhang, Sensitive DNA biosensor improved by Luteolin copper(II) as indicator based on silver nanoparticles and carbon nanotubes modified electrode, *Anal. Chim. Acta*, 651 (2009) 42-47.
- [118] H. Zhao, Z. Li, N.Y. Lee, J.S. Kim, E.-C. Lee, Electrochemical DNA detection using Hoechst dyes in microfluidic chips, *Curr. Appl. Phys.*, 12 (2012) 1493-1496.
- [119] P. Chaumpluk, K. Kerman, Y. Takamura, E. Tamiya, Accumulation of amplified target DNAs using thiol/biotin labeling, S1 nuclease, and ferrocene-streptavidin-magnetic system and a direct detection of specific DNA signals with screen printed gold electrode, *Sci. Tech. Adv. Mater.*, 8 (2007) 323-330.
- [120] K. Hashimoto, K. Miwa, M. Goto, Y. Ishimori, DNA sensor: A novel electrochemical gene detection method using carbon electrode immobilized DNA probes, *Supramol. Chem.*, 2 (1993) 265-270.
- [121] S. Grützke, S. Abdali, W. Schuhmann, M. Gebala, Detection of DNA hybridization using electrochemical impedance spectroscopy and surface enhanced Raman scattering, *Electrochem. Commun.*, 19 (2012) 59-62.
- [122] G. Marrazza, G. Chiti, M. Mascini, M. Anichini, Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA electrochemical biosensor coupled with PCR, *Clin. Chem.*, 46 (2000) 31-37.
- [123] B.Y. Won, D.W. Lee, S.C. Shin, D.-Y. Cho, S.S. Lee, H.C. Yoon, H.G. Park, A DNA intercalation-based electrochemical method for detection of *Chlamydia trachomatis* utilizing peroxidase-catalyzed signal amplification, *Biosensors Bioelectron.*, 24 (2008) 665-669.



- [124] S. Buetow, F. Lisdat, Parallel Detection of Different DNA Sequences on One Gold Electrode, *Electroanalysis*, 22 (2010) 931-937.
- [125] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, Comparison of DNA hybridization at rotating and heated gold disk electrodes, *Electroanalysis*, 19 (2007) 1356-1361.
- [126] M.I. Pividori, A. Merkoci, J. Barbe, S. Alegret, PCR-genosensor rapid test for detecting Salmonella, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1815-1823.
- [127] O. Paenke, A. Kirbs, F. Lisdat, Voltammetric detection of single base-pair mismatches and quantification of label-free target ssDNA using a competitive binding assay, *Biosensors Bioelectron.*, 22 (2007) 2656-2662.
- [128] J. Wang, D.K. Xu, A.N. Kawde, R. Polsky, Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5576-5581.
- [129] J. Wang, R. Polsky, D.K. Xu, Silver-enhanced colloidal gold electrochemical stripping detection of DNA hybridization, *Langmuir*, 17 (2001) 5739-5741.
- [130] S.-W. Yeung, T.M.-H. Lee, H. Cai, I.M. Hsing, A DNA biochip for on-the-spot multiplexed pathogen identification, *Nucleic Acids Res.*, 34 (2006).
- [131] E. Palecek, M. Fojta, Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing, *Talanta*, 74 (2007) 276-290.
- [132] T. Schueler, T. Asmus, W. Fritzsche, R. Moeller, Screen printing as cost-efficient fabrication method for DNA-chips with electrical readout for detection of viral DNA, *Biosensors Bioelectron.*, 24 (2009) 2077-2084.
- [133] F. Patolsky, A. Lichtenstein, M. Kotler, I. Willner, Electronic transduction of polymerase or reverse transcriptase induced replication processes on surfaces: Highly sensitive and specific detection of viral genomes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 2261-2265.
- [134] M. Silvestrini, L. Fruk, P. Ugo, Functionalized ensembles of nanoelectrodes as affinity biosensors for DNA hybridization detection, *Biosensors Bioelectron.*, 40 (2013) 265-270.
- [135] H. Sopha, F. Wachhoz, G.-U. Flechsig, Cathodic adsorptive stripping voltammetric detection of tRNA by labelling with osmium tetroxide, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 1614-1616.

- [136] A. Lermo, S. Campoy, J. Barbe, S. Hernandez, S. Alegret, M.I. Pividori, In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens, *Biosensors Bioelectron.*, 22 (2007) 2010-2017.
- [137] H. Gao, J. Zhong, P. Qin, C. Lin, W. Sun, K. Jiao, Electrochemical DNA hybridization assay for the FMV 35S gene sequence using PbS nanoparticles as a label, *Microchim. Acta*, 165 (2009) 173-178.
- [138] J.H. Zhong, P. Qin, W. Sun, K. Jiao, Simultaneous electrochemical DNA hybridization assay for PAT and FMV 35S gene sequence using quantum dots as labels, *Chin. Chem. Lett.*, 19 (2008) 1244-1247.
- [139] H. Gao, J. Zhong, P. Qin, C. Lin, W. Sun, Microplate electrochemical DNA detection for phosphinothricin acetyltransferase gene sequence with cadmium sulfide nanoparticles, *Microchem. J.*, 93 (2009) 78-81.
- [140] H. Dong, F. Yan, H. Ji, D.K.Y. Wong, H. Ju, Quantum-Dot-Functionalized Poly(styrene-co-acrylic acid) Microbeads: Step-Wise Self-Assembly, Characterization, and Applications for Sub-femtomolar Electrochemical Detection of DNA Hybridization, *Adv. Funct. Mater.*, 20 (2010) 1173-1179.
- [141] F. Azek, C. Grossiord, M. Joannes, B. Limoges, P. Brossier, Hybridization assay at a disposable electrochemical biosensor for the attomole detection of amplified human cytomegalovirus DNA, *Anal. Biochem.*, 284 (2000) 107-113.
- [142] Z.P. Aguilar, Small-volume detection of *Plasmodium falciparum* CSP gene using a 50- $\mu$ m-diameter cavity with self-contained electrochemistry, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 1122-1129.
- [143] F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, Highly sensitive amplified electronic detection of DNA by biocatalyzed precipitation of an insoluble product onto electrodes, *Chem. Eur. J.*, 9 (2003) 1137-1145.
- [144] Y.C. Zhang, A. Pothukuchy, W. Shin, Y. Kim, A. Heller, Detection of similar to  $10^3$  copies of DNA by an electrochemical enzyme-amplified sandwich assay with ambient  $O_2$  as the substrate, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 4093-4097.
- [145] B.S. Ferguson, S.F. Buchsbaum, J.S. Swensen, K. Hsieh, X. Lou, H.T. Soh, Integrated Microfluidic Electrochemical DNA Sensor, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 6503-6508.

- [146] M. Fojta, P. Brazdilova, K. Cahova, P. Pecinka, A single-surface electrochemical biosensor for the detection of DNA triplet repeat expansion, *Electroanalysis*, 18 (2006) 141-151.
- [147] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova, E. Palecek, Electrochemical detection of DNA triplet repeat expansion, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 6532-6533.
- [148] B. Elsholz, R. Worl, L. Blohm, J. Albers, H. Feucht, T. Grunwald, B. Jurgen, T. Schweder, R. Hintsche, Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 4794-4802.
- [149] M. Mascini, M. Del Carlo, M. Minunni, B.N. Chen, D. Compagnone, Identification of mammalian species using genosensors, *Bioelectrochemistry*, 67 (2005) 163-169.
- [150] E. Palecek, M. Fojta, Peer Reviewed: Detecting DNA Hybridization and Damage, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 74 A-83 A.
- [151] J.W. Little, I.R. Lehman, A.D. Kaiser, An Exonuclease Induced by Bacteriophage Lambda I. Preparation of Crystalline Enzyme, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 672-678.
- [152] H.J. Hwang, J.H. Kim, K. Jeong, Method and Apparatus for Amplification of Nucleic Acid Sequences by Using Thermal Convection, in, 2001, Ch. EP 1434880B1.
- [153] M. Hennig, D. Braun, Convective polymerase chain reaction around micro immersion heater, *Appl. Phys. Lett.*, 87 (2005).
- [154] F. Wachholz, J. Gimsa, H. Duwensee, H. Grabow, P. Gründler, G.U. Flechsig, A compact and versatile instrument for radio frequency heating in nonisothermal electrochemical studies, *Electroanalysis*, 19 (2007) 535-540.
- [155] M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Ekren, M. Taylan, Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2181-2187.
- [156] I. Palchetti, S. Laschi, G. Marrazza, M. Mascini, Electrochemical imaging of localized sandwich DNA hybridization using scanning electrochemical microscopy, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 7206-7213.

- [157] T. Reske, Voltammetrische Detektierung der DNA-Hybridisierung von Oligonukleotiden und PCR-Produkten an Goldelektroden mit Osmiumtetroxid als kovalentem Marker, Institut für Chemie, Abteilung Analytische und Technische Chemie, Ph.D., Universität Rostock, Rostock, 2009.
- [158] K. Greisen, M. Loeffelholz, A. Purohit, D. Leong, PCR Primers and Probes for the 16S ribosomal-RNA gene of most Species of Pathogenic Bacteria, Including Bacteria Found in Cerebrospinal-Fluid, *J. Clin. Microbiol.*, 32 (1994) 335-351.
- [159] S. Wilton, D. Cousins, Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube, *Genome Res.*, 1 (1992) 269-273.
- [160] C. Herz, Präparation und Analyse von mit Osmiumtetroxid markierten DNA-Einzelsträngen, Institut für Chemie, Abteilung Analytische und Technische Chemie, Bachelor, Universität Rostock, Rostock, 2012.
- [161] M. Jacobsen, Elektrochemische Detektion der DNA-Hybridisierung mit Osmiumtetroxid-markern ohne Modifizierung der Target-DNA, Institut für Chemie, Abteilung Analytische und Technische Chemie, Diplom, Universität Rostock, Rostock, 2008.
- [162] M. Jacobsen, G.-U. Flechsig, Temperature Control in Electrochemical DNA Sensing, *Curr. Phys. Chem.*, 1 (2011) 292-298.
- [163] F. Wachholz, H. Duwensee, R. Schmidt, M. Zwanzig, J. Gimsa, S. Fiedler, G.-U. Flechsig, Template-Free Galvanic Nanostructuring of Gold Electrodes for Sensitive Electrochemical Biosensors, *Electroanalysis*, 21 (2009) 2153-2159.
- [164] M. Jacobsen, G.-U. Flechsig, Hybridization Detection of Osmium Tetroxide Bipyridine-Labeled DNA and RNA on Heated Gold Wire Electrodes, *Electroanalysis*, (2012) DOI 10.1002/elan.201200460.
- [165] S. Gassmann, H. Gotze, M. Hinze, M. Mix, G.-U. Flechsig, L. Pagel, PCB based DNA detection chip, in: *IECON 2012 - 38th Annual Conference on IEEE Industrial Electronics Society*, 2012, pp. 3982-3986.

## **8. Publikationen**

### **Publikation 1**

Duwensee H, Mix M, Flechsig G-U: Sequence-specific Electrochemical Detection of Nucleic Acids in Real Samples. *Bioanal. Rev.* 2 (1-4); 2010; 103-114

(DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12566-010-0014-x>)

# Sequence-specific electrochemical detection of nucleic acids in real samples

Heiko Duwensee · Maren Mix · Gerd-Uwe Flechsig

Received: 9 April 2010 / Accepted: 26 July 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** This paper reviews past and current developments in the field of electrochemical biosensors with a focus on the sequence-specific detection of nucleic acids in real samples. After electrochemical hybridization sensors had been first described in 1993, it took nearly a decade until some of the many proposed protocols were indeed applied to real samples like blood or tissue. Electrochemical transduction schemes used either rely on electroactive moieties such as intercalators, groove binders, covalently attached labels, and products of enzyme markers or they are completely indicator free like impedance-based detection principles. Most detection schemes require a polymerase chain reaction amplification step to allow for sufficient selectivity and sensitivity. Today, several companies develop electrochemical microarrays able to detect dozens to many thousands of sequences in a single experiment.

**Keywords** Electrochemical biosensor · Hybridization detection · Real sample · Intercalator · Redox label · Indicator free

## Introduction

During the last 17 years, the sequence-specific electrochemical detection of DNA has gained increasing attention and is

nowadays an emerging alternative to the established optical approaches. The reason for this rapid development can be found in the much simpler equipment and analytical protocols and the lower costs of instrumentation and consumables as well as the easier handling. Today's optical approaches for sequence-specific DNA analysis include Southern blotting, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and Sanger sequencing in which labeling and detection are performed by using fluorescent dyes. Whereas Southern blotting is very time consuming, both other methods require expansive and sophisticated instrumentation. Gene expression in cells is often screened using optical microarrays and fluorescent markers.

Emil Palecek was the first researcher to publish on the possibility of an electrochemical DNA detection in 1958 [1] and 1960 [2]. He also introduced the covalent label osmium tetroxide bipyridine [OsO<sub>4</sub>(bipy)] as a powerful tool to study structural properties of natural DNA species [3].

The next major step for the electrochemical DNA detection techniques towards practical applications was the sequence-selective DNA detection as reported by Mikkelsen et al. [4]. They used [Co(phen)]<sup>3+</sup> as an intercalator to detect the sequence-specific hybridization between an adsorptively immobilized DNA probe (on glassy carbon electrodes) and an added target sequence. In the following years, another immobilization method using gold electrodes was reported by several authors. Herne and Tarlov et al. used surface plasmon resonance, XPS, and radioactive labeling to detect the hybridization process between gold surface-confined capture probes and target sequences. They used thiol linkers for the immobilization of the capture probe to the gold electrode [5]. Even base pair mismatches were detected with thiol-immobilized capture probes [6–9]. Capture probes covalently attached to gold were studied by Laforgue et al. [10]. Here, an aniline derivative undergoes a diazotization

---

H. Duwensee · G.-U. Flechsig (✉)  
Gensoric GmbH,  
Schillingallee 68,  
18057 Rostock, Germany  
e-mail: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de

M. Mix · G.-U. Flechsig  
University of Rostock,  
A.-Einstein-Str. 3a,  
18051 Rostock, Germany

reaction, and the formed aryl diazonium ion can then be electrochemically reduced to an aryl radical. This immobilization method is reported to be more robust against elevated temperatures [11] and less prone to oxidation and reduction [12]. In the recent years, the sequence-specific detection of DNA has become also very sensitive. Detection limits down to the femtomolar level were described. Often, enzymatically amplified detection schemes are used [13, 14].

In these pioneering studies, synthetic oligonucleotides played a major role as a model analytic target. Going to real samples of DNA, the analyst is confronted not only with an abundance of accompanying nonspecific DNA but also with double strands that have to be separated in order to become available for hybridization with immobilized capture probes. Even polymerase chain reaction (PCR) basically yields double-stranded products that have to be separated prior to hybridization with probes. Such double-strand denaturation compatible with hybridization and electrochemical detection is therefore an important milestone.

Over the last decade, several very good reviews have been published on the development of electrochemical detection of DNA and electrochemical DNA biosensors [15–30].

The focus of this review will be the sequence-specific electrochemical detection of nucleic acids in real samples.

## Detection of PCR amplicons

Polymerase chain reaction is widely used in order to enhance sensitivity and selectivity of genetic testing protocols. The desired DNA sequence is effectively separated from DNA background and amplified exponentially. However, the PCR product usually consists of double strands that have to be separated prior to hybridization. Efficiency of the latter can be affected this way. Therefore, some of the proposed methods detect the double-stranded PCR products directly. Most others, however, perform thermal denaturation such as by heating to  $>90^{\circ}\text{C}$  followed by rapid cooling on ice.

### Indicator-free methods

#### *Artificial samples*

Indicator-free approaches are compelling due to their simplicity. Usually, the first steps in the development of novel biosensors for the detection of DNA hybridization include working with artificial oligonucleotides as probes and targets before starting on real samples amplified by PCR.

Here, we will give just a short example of such experiments. Cai et al. [31] developed a sensor where the probe is immobilized by direct Si-C bonds to a silicon

electrode. They used complementary and noncomplementary DNA targets for the hybridization without addition of any redox agents and showed the comparison of data achieved by impedance spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Zhu et al. [32] modified their gold electrodes with single-walled carbon nanotubes for the enlargement of the electrode surface and the resulting enlargement of hybridization signals. They were able to discriminate between complementary targets and targets with a three-base-mismatch after 60 min of hybridization with a detection limit of 0.8 pM.

#### *Real samples*

Nevertheless, when working with real samples, the developers of biosensors have to deal with several problems, mainly the high background of unspecific DNA and other disturbing substances in any used crude extracts. Those limitations for the development of specific biosensors have to be overcome first.

Several papers have been published during the last years, describing the detection of PCR amplicons using label-free methods. One approach is to indirectly monitor the progressing PCR itself as proposed by Zhang et al. [33] in 2008. They described the use of a glassy carbon electrode modified with short single-walled carbon nanotubes and measured the concentration of free deoxyguanosine triphosphate (dGTP) in the PCR mixture after the PCR. When the PCR was successful, a decrease of the oxidation signal for dGTP was observed. With this method, they detected the PCR fragments of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV35S) and nopaline synthase (NOS) gene, which are indicators for genetically modified organisms. Transgenic maize samples may also be identified as well.

It is, however, helpful not only to detect that any PCR is running but also to determine the amplification of the desired fragment. This can be achieved by the hybridization of the product with a homologous probe by means of complementary base pairing of those two single-stranded oligonucleotides. Ramanaviciene and Ramanavicius [34] described the use of platinum electrodes modified with single-stranded DNA entrapped within polypyrrole matrices to verify the sequence of the amplified fragment by hybridization with a specific probe. They detected BLV provirus DNA amplified by PCR by means of potential pulse amperometry and electrochemical impedance spectroscopy. The ds PCR product was denatured for 2 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , diluted rapidly in buffer, and then used immediately in the microelectrochemical cell. The detection limit was 0.37 ng/ml. Mixing of the sample with the target DNA (tDNA) at 60 rpm increased the hybridization signal. Ozkan et al. [35] presented the label-free allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation based on the use of

inosine-substituted capture probes. This hybridization scheme was introduced by Wang et al. in 1998 [36]. Ozkan et al. used carbon paste electrodes for the differential pulse voltammetric (DPV) detection of mutant or wild-type genotypes having inosine-substituted capture probes immobilized on the electrode surface. The changes in the peak height of guanine oxidation signals provided the information whether the PCR sample contained heterozygous or homozygous allele. The guanine signal peaks were only detected when hybridization took place because of the guanine-free capture probes. The PCR-amplified targets were heated to 95°C for 6 min, subsequently cooled in an ice bath for 2 min, and then directly applied to the electrode. The authors demonstrated that 93% of their results obtained with electrochemical measurements were confirmed by conventional detection methods [35]. Kara et al. [37] described the detection of achondroplasia G380R mutation by monitoring the oxidation signal of guanine by DPV on carbon paste electrodes. Like Ozkan et al. [35], they used inosine-substituted capture probes related to homozygous or heterozygous alleles of achondroplasia G380R mutation. The PCR-amplified target was denatured as well for 6 min at 95 °C with subsequent cooling in an ice bath for 2 min. The sample was then cast directly onto the electrode surface. They were able to detect 41.24 pM target. Ozkan-Ariksoysal et al. used the same principle [38] for the detection of catechol-*O*-methyltransferase Val108/158Met polymorphism. In contrast to Kara et al. [37] they worked with graphite electrodes. After PCR, purification of the PCR products was performed by means of a *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Applied Science). The denaturation of the PCR products was achieved by heating up to 95°C for 6 min and immediate hybridization with capture probes afterwards. Their detection limit was 2.44 pmol of target sequence in the 30- $\mu$ l samples. Ozkan-Ariksoyal et al. [39] also described the sequence-specific detection of hepatitis B virus (HBV) and two mutations on pencil graphite electrodes (PGE). The guanine oxidation peak was detected by means of DPV. They prepared their PCR-amplified targets the same way as reported earlier [35], by heating to 95°C followed by cooling on ice. They were also able to detect the lamivudine resistance, which could provide fast and cost-efficient point-of-care testing in hospitals. Kara et al. [40] used PGEs with the capture probe electrostatically and chemically immobilized on it, studying sequences from the HBV genome as target DNA. The influence of the probe design for the optimum detection of diseases caused by HBV was investigated, and it was found that the best performance occurred when the probe was homologous to the middle of the amplicon. Here, the PCR-amplified target was denatured by heating to 95°C followed by cooling to 0°C. Again, DPV was found to be

the optimal electrochemical method for the detection of the hybridization between probe and target.

Another approach with PGEs was introduced by Pournaghi-Azar et al. [41] to detect the human interleukin-2 DNA in unpurified PCR-amplified real samples by anodic DPV. The amplified targets were denatured by heating to 95°C followed by immediate cooling on ice. With a hybridization time of 10 min and a sample drop of only 2.5  $\mu$ l, this approach was proven to be highly effective.

Zhang et al. [42] described the use of Au/TiO<sub>2</sub> hollow microsphere films on carbon paste electrodes with Au nanoparticles to detect sequences related to transgenes in transgenic plants. The detection was performed by means of electrochemical impedance spectroscopy. The DNA sample for PCR was extracted from transgenic soybeans. They were able to detect the sequence of the CaMV35S with a detection limit of 230 fM and the PCR product of the terminator of the NOS gene, which are both indicators for transgenic plants.

#### Intercalator-based methods

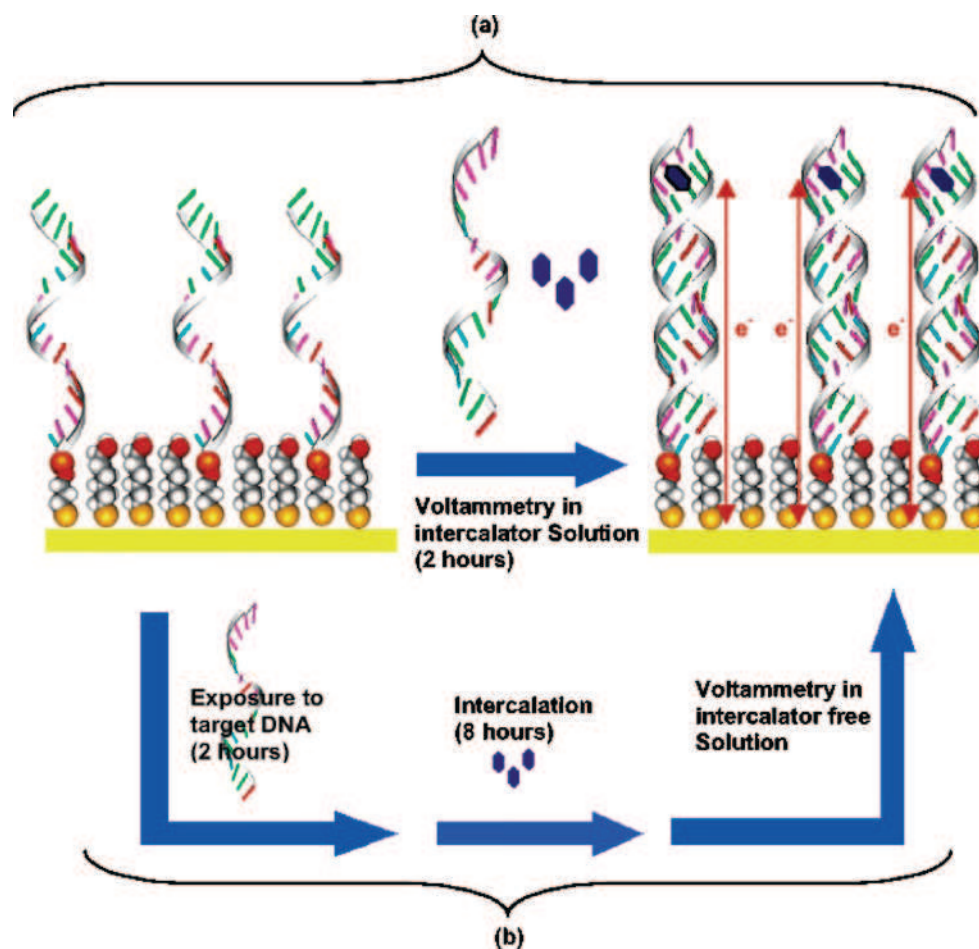
Electroactive intercalators had been used very early to detect the hybridization event between immobilized capture probes and target strands. Covalent modification of target or reporter strands is not necessary; instead, these methods often require an intercalation step prior to electrochemical detection. However, some approaches allow detection of double strands while free intercalator is still present in the electrolyte.

#### Artificial samples

Niu et al. [43] described the use of ssDNA probes bound covalently on glassy carbon electrodes by means of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS). They employed [Co(phen)<sub>2</sub>IP]<sup>2+</sup> as an electroactive marker which intercalates into the DNA. The detection limit for the detection of oligonucleotides derived from the HIV genome was 27 pmol. Wong and Gooding [44] proposed the use of the anionic intercalator anthraquinone monosulfonic acid (AQMS). This intercalator was added to the sample solution in which the gold electrode with immobilized ssDNA probes was dipped (Fig. 1). The detection was possible due to the fact that the reduction currents of AQMS changed significantly when incorporated into the double-stranded DNA (dsDNA) formed by the immobilized probe and the ssDNA target. The authors were able to discriminate between complementary, noncomplementary, and single-base mismatched targets. But again, like mentioned earlier, the high background of unspecific DNA and other disturbing substances in any used crude extracts might



**Fig. 1** Use of intercalator AQMS to detect DNA hybridization on a gold electrode modified with thiol-linked capture probes. **a** In situ voltammetry with having the intercalator present while scanning and **b** with separate intercalation and measurement steps. From [44] with permission



disturb experiments with PCR-amplified samples and also the denaturation of double-stranded PCR-amplified targets has to be performed to allow hybridization with any kind of capture probes.

#### Real samples

Hashimoto et al. [45] demonstrated the detection of the purified and linearized plasmid pVM623 (carrying a fragment of the oncogene *v-myc*). They used chemisorbed oligonucleotides on basal plane pyrolytic graphite electrodes. The hybridization with the linearized plasmid pVM623 was performed after the plasmid was denatured by heat. The detection was conducted after intercalation of acridine orange into the formed double-stranded hybrid of probe and target. They were able to detect a concentration of  $10^{-11}$  g/ml of plasmid. However, they did not use target DNA amplified from DNA isolated from complex real samples like blood or tissue. Marrazza et al. [46] performed the detection of human apolipoprotein E genotypes by means of chronopotentiometric stripping analysis and daunomycin as an intercalator. They attached probes for different genotypes on graphite screen-printed electrodes and used PCR-amplified DNA as target DNA. Genomic DNA used as template for the PCR

was extracted by salting out from blood samples. The target amplified by PCR was denatured by heating to  $95^{\circ}\text{C}$  and subsequently cooling on ice prior to hybridization. After incubation with the target DNA, the biosensor was immersed in a daunomycin solution. The authors found a clear peak increase if hybridization had taken place. Marques et al. reported on electrochemical detection of single-nucleotide polymorphisms [47]. The authors applied different electrochemical techniques to detect DNA polymorphisms in human genes using the model gene cytochrome P450 3A4. The ds PCR fragment was denatured by heating to  $90^{\circ}\text{C}$  for 2 min followed by rapid cooling. The ability of charge transfer along nucleotide stacking was exploited. Each mismatch reduced the current making itself detectable.

Won et al. proposed another strategy for the detection of mismatches [48]. After the hybridization with an immobilized capture probe, the formed double strand with mismatches was cleaved using CEL I endonuclease. Only the perfect complementary strands resulted in a double strand with biotin label. This could be used to bind a glucose oxidase avidin complex. Cyclic voltammograms of 10 mM glucose in phosphate buffer solution containing ferrocenemethanol revealed significant differences between the complementary wild-type, the mutant, and the noncom-

plementary targets. A denaturation step after CEL I treatment was inserted to improve the discrimination between the different genotypes.

Meric et al. [49] described the use of carbon paste electrodes for the detection of TT virus and HBV by means of square wave voltammetry (SWV) measurements and the intercalation of methylene blue (MB) (Fig. 2). ssDNA probes for each of the targets were immobilized on the electrodes and then hybridized with target DNA derived from PCR of virus DNA extracted from blood samples. Again, the DNA targets were denatured by heating to 95°C and subsequently cooling on ice prior to hybridization. A decrease in the MB signal was observed upon successful hybridization.

Kara et al. made use of graphite electrodes and the intercalator Meldola Blue (MDB). The probes were bound covalently to the electrodes by EDC–NHS and were hybridized with PCR products obtained by PCR of DNA extracted from blood. If the sample contained DNA from herpes simplex virus (HSV) types I and II [50], there was a signal increase in the DPV measurements due to the intercalation of MDB into the dsDNA formed by the probe and the target. The DNA was extracted from the blood samples using a salting out technique. Prior to the hybridization step, the PCR solution was heated to 95°C followed by cooling on ice. A similar approach was used for the allele-specific detection of toll-like receptor 2 gene [51]. Here, the authors used the *QIAMP blood DNA mini* kit (Qiagen GmbH) to extract the DNA from blood samples. The hybridization was performed similar to the procedure described above. They were able to differentiate between homozygous wild-type, homozygous mutant, and heterozygous genotypes.

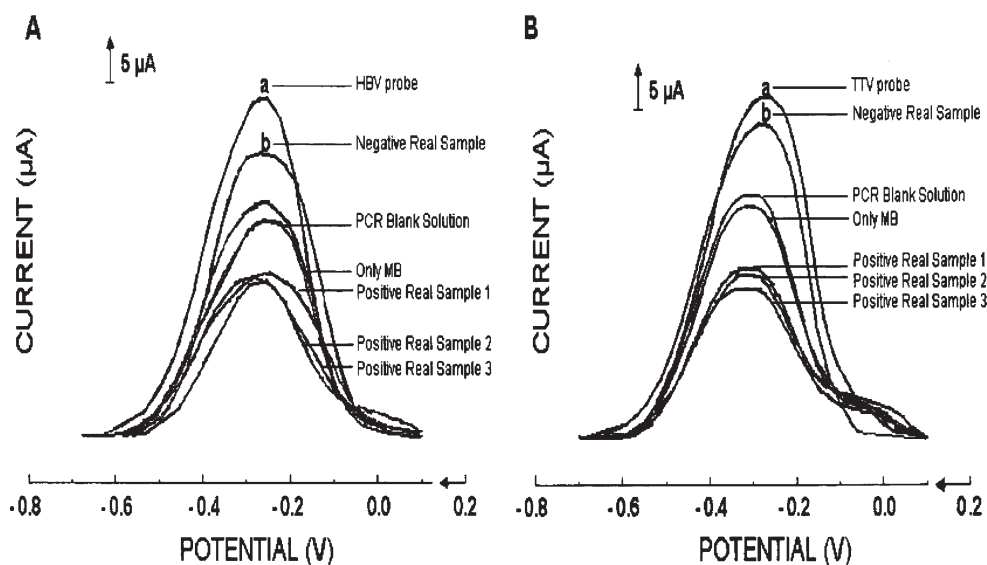
Chaumpluk et al. [52] described the combination of covalently bound ferrocene–streptavidin magnetic beads

(attached to biotinylated PCR products obtained by PCR with one biotinylated primer and one thiolated primer) to enrich the target sample and intercalator Hoechst 33258 for the detection of the PCR products of SSIIB and CryIA sequences from genetically modified maize. DNA from maize samples as target DNA for the PCR was obtained by means of a *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen GmbH). In that work, the PCR product was directly immobilized to the gold electrode by means of its thiolated end. The authors were able to determine the content of genetically modified organisms within the sample and enhanced the signals by using S1 nuclease to degrade ssDNA like primers and unfinished PCR products. Another method mentioned in this paper was the direct binding of PCR products to a carbon electrode and the detection of this binding by means of the intercalator Hoechst 33258; however, better results were received with the method described first. Using the enzyme S1 nuclease after the PCR with the labeled primers led to a higher selectivity of the following hybridization step.

Mandong et al. [53] presented a chitosan-modified carbon paste electrode for the detection of HBV DNA derived from blood samples (salting out method). They observed a decreasing MB signal upon hybridization of the target sequence derived from PCR of HBV DNA. Hybridization was performed without pretreatment of the PCR solution at room temperature in 0.3 M PBS at pH 7.

Won et al. [54] worked with gold electrodes modified with thiolated capture probes. They used chronocoulometric measurements for the detection of *Chlamydia trachomatis* DNA by means of intercalation of an anthraquinone (AQ)–biotin conjugate into the formed dsDNA. An amplification of the signal was achieved by the binding of streptavidin–peroxidase to the incorporated AQ–biotin followed by the reaction of 4-chloronaphthol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The detection

**Fig. 2** SWV signals of methylene blue indicator used to detect PCR amplicons of hepatitis virus from blood samples. This intercalator decreases the signal upon hybridization with the target. From [49] with permission



required less than 4 h to complete. DNA isolation from urine samples was conducted using an *Accuprep Genomic DNA Extraction Kit* (Bioneer). PCR products were further purified by means of a *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen GmbH). The purified PCR products were used for hybridization immediately after a denaturation step at 98°C.

Kerman et al. [55] used gold electrodes as well, but modified with PNA capture probes. When hybridization took place between PNA probe and DNA target, ferrocene-conjugated chitosan nanoparticles were able to bind nonspecifically to the negatively charged backbone of the DNA. The authors used asymmetric PCR to obtain single-stranded products as target DNA and could detect single-nucleotide polymorphism of the ALDH. The DNA was extracted from human hair samples according to the standard protocols of ISO-Hair™ (Nippon Gene Co. Ltd., Toyama, Japan). A standard PCR was performed on the DNA, and the product was used as template for the asymmetric PCR for which a 5:1 forward-to-reverse primer ratio was used.

Zhang et al. [56] described the use of synergistic effects of nano-ZnO-walled carbon nanotubes and chitosan nanocomposite membrane on glassy carbon electrodes. They obtained their DNA from transgenic soybeans according to the method described in the used *plant DNA mini prep kit* (Shanghai Academy of Agricultural Sciences) and performed a standard PCR. Double-stranded PCR products were denatured by heating in boiling water and subsequently cooling on ice prior to use. The measurements were performed by DPV after the incorporation of MB.

Chen et al. [57] used glassy carbon electrodes as well but attached the hairpin DNA probe by means of EDC and NHS. The electrochemically active marker 2-nitroacridone was used for the DPV measurements. The target DNA for PCR was obtained from real samples by performing reverse transcription method on total RNA, which was extracted using a *mini DNA-free total RNA extraction kit* (Waston, Shanghai). The authors were able to detect a decrease in the signal when hybridization between the hairpin probe and the ssDNA target took place. The complementary target and a single-base mismatched target were distinguishable.

Zhu et al. [58] described the detection of NOS (nopaline synthase gene) terminator from genetically modified soybean samples. They used single-stranded oligonucleotide probes attached to gold electrodes by means of EDC–NHS as linkers. Template DNA for the PCR was extracted from transgenic soybeans by means of a *plant DNA Mini Preparation Kit* (Shanghai Academy of Agricultural Sciences). After a standard PCR, the obtained product was denatured using boiling water bath then cooled on ice. Ten microliters of the denatured DNA was cast onto the electrode surface for hybridization. MB was used as intercalator, and the detection was performed by means of CV. Here, an increase of the MB

peak was observed when hybridization between target DNA and probe strands took place.

#### Use of covalent markers

Covalently attached electroactive markers provide some advantages in view of clearness of hybridization signals because, in contrast to most intercalators, the electrochemical signal (most frequently a voltammetric peak) only occurs if the labeled strand is present at the electrode surface. There are basically three ways to make use of this principle. Firstly, the target can be modified directly leading to electrochemical “switch-on” signals upon successful hybridization with the surface-confined capture probe [59, 60]. Secondly, a reporter strand can be utilized that binds onto the target in addition and right beside to the capture probe [61]. Thirdly, in a competitive assay, a labeled signaling strand can be used that will be displaced by the target and therefore will lead to signal decrease (“switch off”) upon hybridization with the target [62, 80].

#### Artificial samples

Pavlovic et al. [63] presented the use of an electrochemical biosensor in a microfluidic device. They worked with oligonucleotide sequences derived from human (H1N1) and avian (H5N1) influenza. Thiolated capture probes were immobilized on gold electrodes, and the hybridization was detected by a decrease of the electrochemical signal due to the MB labels attached to the 3'-end of the probe. They were able to distinguish between the two strains of influenza when using artificial target sequences derived from sequences of these two strains. Bonanni et al. [64] described the use of graphite epoxy composite (GEC) working electrodes for the detection of artificial DNA targets. The probe was absorbed at the electrode surface, and biotinylated oligonucleotides were used as targets. For the signal amplification, gold–streptavidin nanoparticles with silver enhancements were used and showed good reproducibility when measured by means of impedance spectroscopy or scanning electron microscopy.

#### Real samples

Azek et al. [65] described the use of disposable screen-printed carbon electrodes for the detection of human cytomegalovirus (HCMV) DNA. They worked with target DNA obtained by PCR on clinical samples, which were denatured in alkaline media before adsorption at the electrode. A complementary biotinylated probe was hybridized, and then streptavidin–peroxidase conjugate solution was added. The permutation of *o*-phenylenediamine to electrochemically active 2,2'-diaminoazobenzene was determined by means of

DPV. The authors were able to detect HCMV with a detection limit of  $3.6 \times 10^5$  copies per milliliter.

Patolsky et al. [66] demonstrated the introduction of biotinylated dCTP by means of polymerase-induced or reverse-transcriptase-stimulated formation of dsDNA or RNA on an oligonucleotide probe attached to an electrode. A streptavidin–alkaline phosphatase complex was bound to the biotin label and catalyzed the oxidative hydrolysis of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate to the insoluble indigo derivative. This formed an insulating film on the transducer. The detection was performed by means of Faradaic impedance spectroscopy. They were able to reach detection limits of  $2.3 \times 10^{-16}$  M for the DNA of M13 mp8 (M13 $\Phi$ ) and  $1 \times 10^{-17}$  M for the RNA of vesicular stomatitis virus.

Huang et al. [61] described the use of a streptavidin-coated carbon paste electrode for the detection of single-nucleotide polymorphisms. They found the use of hairpin probes useful for the detection of single-base mismatch detection. Template DNA for the PCR was obtained by extraction from blood using a commercially available process based on the absorption of DNA to a silica membrane after lysis with a proprietary agent (Diagen) and proteinase K in the presence of a high salt concentration and 33% isopropanol. After a standard PCR, the products were further purified using a *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH). Their approach was to incubate the target, a biotin-labeled capture probe, and a fluorescein-labeled detector probe and then attach the formed complex to the electrode by streptavidin–biotin binding. After the addition of a horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-fluorescein monoclonal antibody, the substrate K-blue was added, and its conversion was measured by amperometric detection. With this method, they were able to detect the factor V Leiden mutation in real samples.

Another method for the detection of factor V Leiden mutation was presented by Ozsoz et al. in 2003 [67]. They described the use of PGEs modified with target DNA for mutant or wild-type DNA. The authors used synthetic oligonucleotides, a 131-base ssDNA, or a 256-base PCR product as targets. PCR products were denatured by heating to 95°C followed by chilling on ice. Capture probes were attached to Au nanoparticles. Hybridization was performed for 1 h at 8°C between target-modified PGE and Au-nanoparticle-tagged capture probes when denatured PCR products were used as targets. After that, the oxidation signal of Au was measured by means of DPV. They were able to discriminate between homozygous mutation and heterozygous mutation and found a detection limit of 0.78 fmol.

Patolsky et al. [68] showed the detection of the Tay-Sachs genetic disorder in clinical real samples. They used an immobilized oligonucleotide as capture probe on an Au/quartz crystal and a nucleic-acid-functionalized alkaline

phosphatase as reporter probe. The detection was performed as described earlier [66]. They detected a four-base insertion in exon 11, which is the most frequent mutation to trigger this disease. The mutant could be detected with a  $5 \times 10^{-13}$  M detection limit.

Fojta et al. [69] presented double-surface techniques for the detection of (GAA)<sub>n</sub> repeat expansions, which are an indicator for Friedreich's ataxia (FRDA). Double-stranded PCR products were thermally denatured tDNA, modified with [OsO<sub>4</sub>(bipy)] (“Os,bipy”) and then captured by magnetic beads working as hybridization surface. This chemical modification also prevents renaturation of the target. Biotin-labeled reporter probes (RP-biot) were hybridized to the tDNA. The electrochemical signal was related to the (GAA)<sub>n</sub> length in the tDNA. The detection was achieved by means of an electrochemical enzyme-linked assay in which a streptavidin–alkaline phosphatase conjugate was linked to the biotin, and conversion of 1-naphthyl phosphate to 1-naphthol was determined at carbon electrodes. The relative length of the triplet expansion was calculated from the ratio of the electrochemical signal intensities of hybridized RP-biot (enzyme-linked assay)/tDNA (Os,bipy-label). They showed an almost linear increase of signal height for concentrations of tDNA between 0.5 and 10 ng/μl. This method also worked for DNA samples extracted from human whole blood. This group presented a similar approach in 2006 [70] when they used a single-surface electrochemical biosensor to detect FRDA. The tDNA was adsorbed to the electrode surface (PGE or screen-printed carbon electrode) and hybridized with RP-biot to enable the enzyme-linked assay. To normalize the signals from samples received from PCR products, the signals obtained from both the Os,bipy-labels and the enzyme-linked hybridization assay were compared. The authors found a relation between the lengths of the repeats and the signal heights. The same results were received when using samples from human genomic DNA. The authors stressed that, for all experiments, it was necessary that right after the adsorption of tDNA to the electrode, the electrode surface had to be blocked by means of bovine serum albumin. They also found the denaturation of the dsDNA from the PCR to be highly important for sensitivity. They used 50 mM NaOH for chemical denaturation and were able to detect 0.2 μg/ml tDNA. Rapid renaturation of the separated target strands was avoided by adsorption under denaturing conditions.

A system similar to that in [68] was used by Pavlov et al. [71] to detect telomerase activity in extracts of HeLa cells. Again, one oligonucleotide was attached to an electrode and acted as primer for the telomerase. The second biotinylated oligonucleotide was then able to hybridize with the newly formed DNA strand. After addition of an

avidin–alkaline phosphatase complex and the resulting formation of the insoluble indigo derivative by hydrolysis of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, the resulting blocking of the electrode surface was detected by means of chronopotentiometry. No telomerase activity was detected when the HeLa cells were heat-treated (85°C, 10 min).

Nebeling et al. [72] described the use of ultramicroelectrode arrays with eight electrodes for the detection of viral DNA. The immobilization of the capture probes for the viruses cytomegalovirus, Epstein–Barr virus, and HSV was performed via thiol–gold self-assembling. DNA as template for the PCR was purified using a *QIAamp Blood Kit* from Qiagen GmbH. The PCR was performed with multiplex primers (one of them biotinylated). The PCR products were denatured and immediately incubated with the immobilized probes. After addition of ExtrAvidin alkaline phosphatase conjugate, the substrate 4-aminophenyl phosphate was transformed into the electrochemically active 4-aminophenol allowing hybridization detection. The authors were able to detect 2 nM virus DNA directly out of the multiplex PCR.

Palchetti et al. [73] used scanning electrochemical microscopy (SECM) for the detection of PCR amplicons. They attached thiol-tethered oligonucleotide probes on a gold surface. These probes were hybridized with unmodified targets and biotinylated signaling probes to form a sandwich. PCR-amplified targets were denatured at 100°C followed by cooling in a water bath. After addition of streptavidin–alkaline phosphatase, the oxidation of 4-chloro-1-naphthol in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> took place. The insoluble and insulating product changed the surface conductivity, which could be sensitively detected by means of SECM. The imaging of 60 nM PCR amplicon was demonstrated.

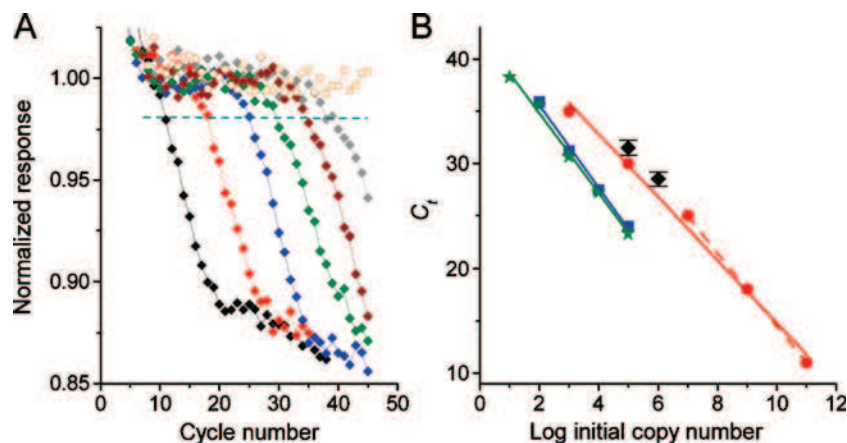
Lermo et al. [74] proposed different approaches for the electrochemical detection of food pathogens, *Salmonella* spp., based on the specific IS200 element. Purified DNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 was used as a target for the PCR. For their first approach, they used two labeled primers, one was biotinylated and the other was labeled with digoxigenin (DIG) to produce a double-labeled PCR product which was then immobilized on streptavidin-coated magnetic beads. These modified beads were then captured by the magneto GEC (m-GEC) transducer. Their second approach of producing a DNA target consisted of one biotinylated primer immobilized on magnetic beads and a DIG-labeled primer. The resulting PCR product was already immobilized on the magnetic beads, and therefore it was possible as well to capture the DNA with the m-GEC sensor. The detection was enabled due to the DIG labeling, which allowed the modification with an anti-DIG–HRP conjugate. The activity of the enzyme was measured using chronoamperometry.

Hydroquinone was used as a mediator and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a substrate. Mismatch detection was possible when applying chemically stringent conditions using 50% (v/v) formamide in the 5× SSC measuring buffer.

Miranda-Castro et al. [75] demonstrated the detection of *Legionella pneumophila* by means of DPV. They used a hairpin loop capture probe immobilized by a thiol linker on gold electrodes and a mixture of ds target DNA and a signaling probe labeled with biotin. Double-stranded target DNA was heated to 98°C in the presence of the signaling probe and cooled to 0°C to avoid amplicon strand reannealing. Incubation of the electrode with this mixture was followed by addition of streptavidin labeled with alkaline phosphatase. This enzyme triggered the reaction of 1-naphthyl phosphate to 1-naphthol which was then detected by DPV. This method allowed the reliable detection of 100 copies of the genome of *L. pneumophila*.

Horakova-Brazdilova et al. [76] described the detection of the human tumor suppressor gene *p53*. They used the same approach as demonstrated in [70] and were able to detect 15 µg/ml of tDNA, which corresponds with 0.75 pmol of specific sequence. Furthermore, they demonstrated the combination of this electrochemical enzyme-linked DNA hybridization with reverse transcription of RNA followed by PCR amplification of the resulting cDNA with specific primers (RT-PCR) to examine the expression of gene *rbcL* encoding a subunit of the enzyme Rubisco. This enzyme is known to be expressed in green parts of plants upon illumination as it is involved in photosynthesis. When using tDNA obtained from PCR on genomic DNA, the gene *rbcL* was detected in both green leaves and callus samples whereas when tDNA is obtained by RT-PCR on whole RNA, signals were detected only in the samples from green leaves. The third described method is the primer-extension-based DNA sensing. In this method, an unlabeled probe is attached to the tDNA. This serves as a primer for the labeled DNA synthesis in which dU<sup>bio</sup>TP is incorporated into the synthesized DNA. Due to multiple tags per primer extension (PEX) product, a signal enhancement is achieved. When RT-PCR products of *rbcL* prepared from green tobacco leaves or nongreen material from tobacco were analyzed by the PEX method, signals were obtained only in *rbcL*-expressing green leaves and signals were significantly higher compared with those measurements where only RT-PCR products were used.

The same group proposed the detection of nucleotide polymorphisms in *p53* mutation hotspots and expression of mutant *p53* in human cell lines [77]. Combining the double-surface technique [70] with RT-PCR and PEX [76], they were able to detect single-nucleotide polymorphism in samples received from cell cultures, differentiating mutant and wild-type genotypes where mutant genotypes indicate the inability of *p53* to act as a tumor suppressor.



**Fig. 3** Electrochemical real-time PCR based on  $[(Ru(bpy)_3)_3]^{3+}$ -mediated cyclic voltammetric monitoring of dGTP consumption. As in optical real-time PCR, the quantification is possible by plotting cycle number after which the fixed normalized threshold response

(dashed light blue line in **A**) is reached versus template concentration. In **B**, the diamonds and bullets represent electrochemical detection, whereas stars and squares depict classic fluorescent (TaqMan) comparison experiments. From [79] with permission

Ferguson et al. [78] constructed an integrated microfluidic electrochemical DNA sensor for the detection of the *gyrB* gene from *Salmonella enterica*. PCR, enzymatic digestion of the PCR product to a ssDNA target, and the detection of the DNA on a gold electrode by means of AC voltammetry therefore took place on one chip. For the PCR, genomic DNA from *S. enterica* obtained from ATCC (Manassas, VA) was used as a template. They also used one phosphorylated primer so that the digestion of the PCR product to a ssDNA target (using Lambda exonuclease) could take place. The hairpin DNA probe was immobilized on the electrode by means of thiol linkers and was covalently labeled with MB. Therefore, when measured with AC voltammetry, a decrease of electrochemical signal was observed when hybridization took place. With this “switch-off” method, a detection limit of 10 aM (300 copies of target DNA) was reached.

Défèver et al. [79] demonstrated an example of real-time PCR with electrochemical detection using cyclic voltammetry on screen-printed electrodes. The progressive consumption of free electroactive deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) used for DNA synthesis was monitored (Fig. 3). This was accomplished by exploiting the fast catalytic oxidation of native dGTP or its unnatural analog 7-deaza-dGTP by the one-electron redox catalysts  $[Ru(bipy)_3]^{3+}$  or  $[Os(bipy)_3]^{3+}$  generated at the electrode. A detection step was not as high as compared with the optical-based real-time PCR.

Liepold et al. from FRIZ Biochem GmbH (Germany) reported on PCR product detection using a competitive assay on gold electrodes modified with capture probes and signaling oligos labeled with osmium(II/III) complexes and ferrocene [80]. Using a *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen NV), the DNA templates were isolated from clinical specimens.

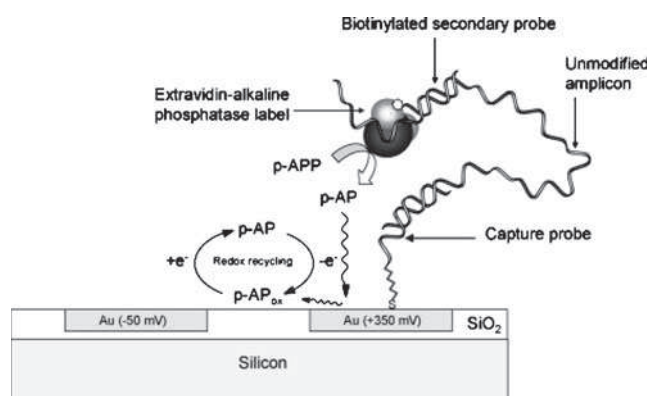
Ghindilis et al. from CombiMatrix (USA) developed an electrochemical microarray comprising >12,000 electrodes,

which is able to monitor gene expression [81]. The RNA is amplified by PCR, and amplicons are detected by means of enzymatic amplification with HRP labels as implemented in the ElectraSense™ protocol.

#### Direct PCR-free detection in real samples

Since PCR requires several handling steps, bears risk of contamination and false positives, and takes a long time to complete, people have proposed direct sequence-specific detection of DNA and RNA.

Mascini and coworkers proposed the use of inosine-modified (guanine-free) capture probes immobilized on screen-printed graphite electrodes for the identification of mammalian species [82]. Genomic DNA was extracted from unprocessed tissue samples. In the next step, the



**Fig. 4** Use of enzyme-labeled reporter strands (secondary probes) to detect unmodified single-stranded PCR products or rRNA by capture probes immobilized on gold electrodes. The enzyme-amplified signal is further amplified electrochemically by redox cycling. From [22] with permission

sample was treated with ribonuclease A and then incubated with proteinase K. To further purify the sample, several steps of extractions and precipitation followed. For the hybridization, the target solution was given directly to the activated electrode surface (screen-printed electrode with immobilized capture probe) for 10 min. After the hybridization with the complementary target, the guanine oxidation could be detected using SWV. Under optimized conditions, the authors reached a detection limit of 30 µg/ml, and so they were able to discriminate between different species.

Sequence-specific PCR-free detection can also be performed based upon rRNA extracted from bacteria cells. These RNA species can be found in many copies in each cell. Elsholz et al. (eBiochip GmbH, Germany) described amperometric detection and quantification of 16S rRNA from different bacteria such as *E. coli* and *S. aureus* [83]. Extraction of total RNA was conducted, and a 0.5-ng/µl detection limit was reached using reporter strands with alkaline phosphatase labels and capture probes immobilized on gold electrodes (Fig. 4).

Another enzymatic amplification approach to detect rRNA from various bacteria has been reported by Liao et al. (GeneFluidics, USA) [84]. In this case, an HRP label at the reporter probe and the substrate *K-Blue Aqueous TMB* (Neogen, Lexington, KY) were used to perform amperometric detection.

## Conclusions

After one decade of exploring different electrochemical approaches to detect model analytes of nucleic acids in a sequence-specific manner, many reports have been published on how to apply these techniques to real samples. In most cases, DNA is extracted and then amplified by PCR. The PCR products are then thermally or chemically denatured and hybridized with electrode surface-confined capture probes. Chemical modification of the single strands with osmium tetroxide bipyridine prevents renaturation. The hybridization events can be detected indicator free by using intercalators or electrochemical impedance spectroscopy. Alternatively, electroactive labels can be covalently attached to target or signaling strands. Such labels can be enzymes that produce vast amounts of redox-active products, leading to further amplified electrochemical signals.

PCR can be omitted in case of bacterial rRNA, which is found in many copies in each bacterial cell and can be specifically detected in the total RNA fraction.

Several companies such as FRIZ Biochem GmbH and eBiochip GmbH in Germany as well as Combimatrix, Osmetech, and GeneFluidics in the USA have presented electrochemical chips and devices capable of performing routine genetic tests.

Future development will lead to electrochemical real-time PCR analysis of real samples. This will allow quantification of such as infectious microorganisms and rapid point-of-care medical diagnosis with compact analysis devices. Another important future direction will be electrochemical detection of various RNA species in real samples.

## References

1. Palecek E (1958) Oszillographische Polarographie der Nucleinsäuren und ihrer Bestandteile. *Naturwiss* 45(8):186–187
2. Palecek E (1960) Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid. *Nature* 188(4751):656–657
3. Palecek E, Boublikova P, Galazka G, Klysik J (1987) Inhibition of restriction endonuclease cleavage due to site-specific chemical modification of the B-Z junction in supercoiled DNA. *Gen Physiol Biophys* 6(4):327–341
4. Millan KM, Mikkelsen SR (1993) Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. *Anal Chem* 65(17):2317–2323
5. Peterlinz KA, Georgiadis RM, Herne TM, Tarlov MJ (1997) Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc* 119(14):3401–3402
6. Kelley SO, Jackson NM, Hill MG, Barton JK (1999) Long-range electron transfer through DNA films. *Angew Chem Int Ed* 38(7):941–945
7. Kelley SO, Boon EM, Barton JK, Jackson NM, Hill MG (1999) Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acids Res* 27(24):4830–4837
8. Boon EM, Ceres DM, Drummond TG, Hill MG, Barton JK (2000) Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nat Biotechnol* 18(10):1096–1100
9. Boon EM, Barton JK (2002) Charge transport in DNA. *Curr Opin Struct Biol* 12(3):320–329
10. Laforgue A, Addou T, Bélanger D (2005) Characterization of the deposition of organic molecules at the surface of gold by the electrochemical reduction of aryl diazonium cations. *Langmuir* 21(15):6855–6865
11. Liu G, Böcking T, Gooding JJ (2007) Diazonium salts: stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. *J Electroanal Chem* 600(2):335–344
12. Harper JC, Polsky R, Wheeler DR, Dirk SM, Brozik SM (2007) Selective immobilization of DNA and antibody probes on electrode arrays: simultaneous electrochemical detection of DNA and protein on a single platform. *Langmuir* 23(16):8285–8287
13. Caruana DJ, Heller A (1999) Enzyme-amplified amperometric detection of hybridization and of a single base pair mutation in an 18-base oligonucleotide on a 7-µm-diameter microelectrode. *J Am Chem Soc* 121(4):769–774
14. Zhang Y, Kim HH, Heller A (2003) Enzyme-amplified amperometric detection of 3000 copies of DNA in a 10-µL droplet at 0.5 fM concentration. *Anal Chem* 75(13):3267–3269
15. Palecek E (2002) Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta* 56(5):809–819
16. Wang J (2002) Electrochemical nucleic acid biosensors. *Anal Chim Acta* 469(1):63–71
17. Wang J (2003) Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Anal Chim Acta* 500(1–2):247–257
18. Gooding JJ (2002) Electrochemical DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis* 14(17):1149–1156

19. Drummond TG, Hill MG, Barton JK (2003) Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol* 21(10):1192–1199
20. Kerman K, Kobayashi M, Tamiya E (2004) Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Meas Sci Technol* 15(2):R1–R11
21. Fang Y, Xu Y, He P (2005) DNA biosensors based on metal nanoparticles. *J Biomed Nanotech* 1(3):276–285
22. Lucarelli F, Tombelli S, Minunni M, Marrazza G, Mascini M (2008) Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Anal Chim Acta* 609(2):139–159
23. Cagnin S, Caraballo M, Guiducci C, Martini P, Ross M, SantaAna M, Danley D, West T, Lanfranchi G (2009) Overview of electrochemical DNA biosensors: new approaches to detect the expression of life. *Sensors* 9(4):3122
24. Qureshi A, Kang WP, Davidson JL, Gurbuz Y (2009) Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications. *Diamond Relat Mater* 18(12):1401–1420
25. Sadik OA, Aluoch AO, Zhou A (2009) Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. *Biosens Bioelectron* 24(9):2749–2765
26. Luo X, Hsing IM (2009) Electrochemical techniques on sequence-specific PCR amplicon detection for point-of-care applications. *Analyst* 134(10):1957–1964
27. Batchelor-McAuley C, Wildgoose GG, Compton RG (2009) The physicochemical aspects of DNA sensing using electrochemical methods. *Biosens Bioelectron* 24(11):3183–3190
28. Rivas GA, Pedano ML, Ferreyra NF (2005) Electrochemical biosensors for sequence-specific DNA detection. *Anal Lett* 38(15):2653–2703
29. Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castanón MJ, Miranda-Orderes AJ, Tunón-Blanco P (2009) Structured nucleic acid probes for electrochemical devices. *Electroanalysis* 21(19):2077–2090
30. De-los-Santos-Álvarez P, Lobo-Castanón MJ, Miranda-Orderes AJ, Tunón-Blanco P (2003) Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications. *Electroanalysis* 16(15):1193–1204
31. Cai W, Peck JR, van der Weide DW, Hamers RJ (2004) Direct electrical detection of hybridization at DNA-modified silicon surfaces. *Biosens Bioelectron* 19(9):1013–1019
32. Zhu N, Lin Y, Yu P, Su L, Mao L (2009) Label-free and sequence-specific DNA detection down to a picomolar level with carbon nanotubes as support for probe DNA. *Anal Chim Acta* 650(1):44–48
33. Zhang XZ, Liu SF, Jiao K, Gao H, Shi Y (2008) Rapid and cost-effective detection of sequence-specific DNA by monitoring the electrochemical response of 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate in a PCR sample. *Analyst* 133(12):1729–1735
34. Ramanaviciene A, Ramanavicius A (2004) Pulsed amperometric detection of DNA with an ssDNA/polypyrrole-modified electrode. *Anal Bioanal Chem* 379(2):287–293
35. Ozkan D, Erdem A, Kara P, Kerman K, Meric B, Hassmann J, Ozsoz M (2002) Allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation from polymerase chain reaction amplicons based on label-free electrochemical genosensor. *Anal Chem* 74(23):5931–5936
36. Wang J, Rivas G, Fernandes JR, Paz JLL, Jiang M, Waymire R (1998) Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal Chim Acta* 375(3):197–203
37. Kara P, Ozkan D, Erdem A, Kerman K, Pehlivan S, Ozkinay FUD, Itirli G, Ozsoz M (2003) Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology. *Clin Chim Acta* 336(1–2):57–64
38. Ozkan-Ariksoysal D, Tezcanli B, Kosova B, Ozsoz M (2008) Design of electrochemical biosensor systems for the detection of specific DNA sequences in PCR-amplified nucleic acids related to the catechol-*O*-methyltransferase val108/158Met polymorphism based on intrinsic guanine signal. *Anal Chem* 80(3):588–596
39. Ozkan-Ariksoysal D, Karadeniz H, Erdem A, Sengonul A, Sayiner AA, Ozsoz M (2005) Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance. *Anal Chem* 77(15):4908–4917
40. Kara P, Cavdar S, Meric B, Erensoy S, Ozsoz M (2007) Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological diseases. *Bioelectrochemistry* 71(2):204–210
41. Pournaghi-Azar MH, Alipour E, Zununi S, Froohandeh H, Hejazi MS (2008) Direct and rapid electrochemical biosensing of the human interleukin-2 DNA in unpurified polymerase chain reaction (PCR)-amplified real samples. *Biosens Bioelectron* 24(4):524–530
42. Zhang YC, Yang T, Zhou N, Zhang W, Jiao K (2008) Nano Au/TiO<sub>2</sub> hollow microsphere membranes for the improved sensitivity of detecting specific DNA sequences related to transgenes in transgenic plants. *Sci China Ser B Chem* 51(11):1066–1073
43. Niu SY, Zhang SS, Wang L, Li X-M (2006) Hybridization biosensor using di(1,10-phenanthroline) (imidazo[*f*]1,10-phenanthroline) cobalt(II) as electrochemical indicator for detection of human immunodeficiency virus DNA. *J Electroanal Chem* 597(2):111–118
44. Wong ELS, Gooding JJ (2006) Charge transfer through DNA: a selective electrochemical DNA biosensor. *Anal Chem* 78(7):2138–2144
45. Hashimoto K, Miwa K, Goto M, Ishimori Y (1993) DNA sensor: a novel electrochemical gene detection method using carbon electrode immobilized DNA probes. *Supramol Chem* 2(4):265–270
46. Marrazza G, Chiti G, Mascini M, Anichini M (2000) Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA electrochemical biosensor coupled with PCR. *Clin Chem* 46(1):31–37
47. Marques LPJ, Cavaco I, Pinheiro JP, Ribeiro V, Ferreira GNM (2003) Electrochemical DNA sensor for detection of single nucleotide polymorphism. *Clin Chem Lab Med* 41(4):475–481
48. Won BY, Shin SC, W-y C, Shin S, Cho D-Y, Park HG (2009) Mismatch DNA-specific enzymatic cleavage employed in a new method for the electrochemical detection of genetic mutations. *Chem Commun* 28:4230–4232
49. Meric B, Kerman K, Ozkan D, Kara P, Erensoy S, Akarca US, Mascini M, Ozsoz M (2002) Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta* 56(5):837–846
50. Kara P, Meric B, Zeytinoglu A, Ozsoz M (2004) Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex type I and type II viruses from PCR amplified real samples. *Anal Chim Acta* 518(1–2):69–76
51. Kara P, Cavdar S, Berdeli A, Ozsoz M (2007) Electrochemical genosensor design for allele-specific detection of toll-like receptor-2 gene polymorphism. *Electroanalysis* 18(18):1875–1882
52. Chaumpluk P, Kerman K, Takamura Y, Tamiya E (2007) Accumulation of amplified target DNAs using thiol/biotin labeling, S1 nuclease, and ferrocene-streptavidin-magnetic system and a direct detection of specific DNA signals with screen printed gold electrode. *Sci Technol Adv Mater* 8(4):323–330
53. Mandong G, Yanqing L, Hongxia G, Xiaoqin W, Lifang F (2007) Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. *Bioelectrochemistry* 70(2):245–249
54. Won BY, Lee DW, Shin SC, Cho D-Y, Lee SS, Yoon HC, Park HG (2008) A DNA intercalation-based electrochemical method for detection of *Chlamydia trachomatis* utilizing peroxidase-catalyzed signal amplification. *Biosens Bioelectron* 24(4):665–669



55. Kerman K, Saito M, Tamiya E (2008) Electroactive chitosan nanoparticles for the detection of single-nucleotide polymorphisms using peptide nucleic acids. *Anal Bioanal Chem* 391(8):2759–2767
56. Zhang W, Yang T, Huang D, Jiao K, Li G (2008) Synergistic effects of nano-ZnO/multi-walled carbon nanotubes/chitosan nanocomposite membrane for the sensitive detection of sequence-specific of PAT gene and PCR amplification of NOS gene. *J Membr Sci* 325(1):245–251
57. Chen J, Zhang J, Wang K, Huang L, Lin X, Chen G (2008) Electrochemical biosensor based on hairpin DNA probe using 2-nitroacridone as electrochemical indicator for detection of DNA species related to chronic myelogenous leukemia. *Electrochem Commun* 10(10):1448–1451
58. Zhu L, Zhao R, Wang K, Xiang H, Shang Z, Sun W (2008) Electrochemical behaviors of methylene blue on DNA modified electrode and its application to the detection of PCR product from NOS sequence. *Sensors* 8(9):5649–5660
59. Reske T, Mix M, Bahl H, Flechsig GU (2007) Electrochemical detection of osmium tetroxide-labeled PCR-products by means of protective strands. *Talanta* 74(3):393–397
60. Mix M, Reske T, Duwensee H, Flechsig GU (2009) Electrochemical detection of asymmetric PCR products by labeling with osmium tetroxide. *Electroanalysis* 21(7):826–830
61. Huang TJ, Liu MS, Knight LD, Grody WW, Miller JF, Ho C-M (2002) An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes. *Nucleic Acids Res* 30(12):e55
62. Duwensee H, Jacobsen M, Flechsig GU (2009) Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxide-labelled signalling strands. *Analyst* 134(5):899–903
63. Pavlovic E, Lai RY, Wu TT, Ferguson BS, Sun R, Plaxco KW, Soh HT (2008) Microfluidic device architecture for electrochemical patterning and detection of multiple DNA sequences. *Langmuir* 24(3):1102–1107
64. Bonanni A, Esplandiú MJ, del Valle M (2008) Signal amplification for impedimetric genosensing using gold–streptavidin nanoparticles. *Electrochim Acta* 53(11):4022–4029
65. Azek F, Grossiord C, Joannes M, Limoges B, Brossier P (2000) Hybridization assay at a disposable electrochemical biosensor for the attomole detection of amplified human cytomegalovirus DNA. *Anal Biochem* 284(1):107–113
66. Patolsky F, Lichtenstein A, Kotler M, Willner I (2001) Electronic transduction of polymerase or reverse transcriptase induced replication processes on surfaces: highly sensitive and specific detection of viral genomes. *Angew Chem Int Ed* 40(12):2261–2265
67. Ozsoz M, Erdem A, Kerman K, Ozkan D, Tugrul B, Topcuoglu N, Ekren H, Taylan M (2003) Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. *Anal Chem* 75(9):2181–2187
68. Patolsky F, Lichtenstein A, Willner I (2003) Highly sensitive amplified detection of DNA by biocatalyzed precipitation of an insoluble product onto electrodes. *Chem Eur J* 9(5):1137–1145
69. Fojta M, Havran L, Vojtiskova M, Palecek E (2004) Electrochemical detection of DNA triplet repeat expansion. *J Am Chem Soc* 126(21):6532–6533
70. Fojta M, Brázdilová P, Cahová K, Pecinka C (2006) A single-surface electrochemical biosensor for the detection of DNA triplet repeat expansion. *Electroanalysis* 18(2):141–151
71. Pavlov V, Willner I, Dishon A, Kotler M (2004) Amplified detection of telomerase activity using electrochemical and quartz crystal microbalance measurements. *Biosens Bioelectron* 20(5):1011–1021
72. Nebling E, Grunwald T, Albers J, Schafer P, Hintsche R (2004) Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays. *Anal Chem* 76(3):689–696
73. Palchetti I, Laschi S, Marrazza G, Mascini M (2007) Electrochemical imaging of localized sandwich DNA hybridization using scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem* 79(18):7206–7213
74. Lermo A, Campoy S, Barbe J, Hernandez S, Alegret S, Pividori MI (2007) In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. *Biosens Bioelectron* 22(9–10):2010–2017
75. Miranda-Castro R, de-los-Santos-Alvarez N, Lobo-Castanon MJ, Miranda-Ordieres AJ, Tunon-Blanco P (2009) PCR-coupled electrochemical sensing of *Legionella pneumophila*. *Biosens Bioelectron* 24(8):2390–2396
76. Horakova-Brazdilova P, Fojtova M, Vytras K, Fojta M (2008) Enzyme-linked electrochemical detection of PCR-amplified nucleotide sequences using disposable screen-printed sensors. Applications in gene expression monitoring. *Sensors* 8:193–210
77. Horáková P, Šimková E, Vychodilová Z, Brázdová M, Fojta M (2009) Detection of single nucleotide polymorphisms in p53 mutation hotspots and expression of mutant p53 in human cell lines using an enzyme-linked electrochemical assay. *Electroanalysis* 21(15):1723–1729
78. Ferguson BS, Buchsbaum SF, Swensen JS, Hsieh K, Lou X, Tom Soh H (2009) Integrated microfluidic electrochemical DNA sensor. *Anal Chem* 81(15):6503–6508
79. Defever T, Druet M, Rochelet-Dequaire M, Joannes M, Grossiord C, Limoges B, Marchal D (2009) Real-time electrochemical monitoring of the polymerase chain reaction by mediated redox catalysis. *J Am Chem Soc* 131(32):11433–11441
80. Liepold P, Kratzmüller T, Persike N, Bandilla M, Hinz M, Wieder H, Hillebrandt H, Ferrer E, Hartwich G (2008) Electrically detected displacement assay (EDDA): a practical approach to nucleic acid testing in clinical or medical diagnosis. *Anal Bioanal Chem* 391(5):1759–1772
81. Ghindilis AL, Smith MW, Schwarzkopf KR, Roth KM, Peyvan K, Munro SB, Lodes MJ, Stöver AG, Bernards K, Dill K, McShea A (2007) CombiMatrix oligonucleotide arrays: genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection. *Biosens Bioelectron* 22(9–10):1853–1860
82. Mascini M, Carlo MD, Minunni M, Cheng B, Compagnone D (2005) Identification of mammalian species using genosensors. *Bioelectrochemistry* 67(2):163–169
83. Elsholz B, Wörl R, Blohm L, Albers J, Feucht H, Grunwald T, Jürgen B, Schweder T, Hintsche R (2006) Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal Chem* 78(14):4794–4802
84. Liao JC, Mastali M, Li Y, Gau V, Suchard MA, Babbitt J, Gornbein J, Landaw EM, McCabe ERB, Churchill BM, Haake DA (2007) Development of an advanced electrochemical DNA biosensor for bacterial pathogen detection. *J Mol Diagn* 9(2):158–168

## **Publikation 2**

Reske T, Mix M, Bahl H, Flechsig G-U: Electrochemical detection of osmium tetroxide labeled PCR products by means of protective strands. *Talanta* 74 (3); 2007; 393-397

(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2007.09.004>)

# Electrochemical detection of osmium tetroxide-labeled PCR-products by means of protective strands

Thomas Reske<sup>a</sup>, Maren Mix<sup>a,b</sup>, Hubert Bahl<sup>b</sup>, Gerd-Uwe Flechsig<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Rostock, Department of Chemistry, Dr. -Lorenz-Weg 1, D-18051 Rostock, Germany

<sup>b</sup> University of Rostock, Department of Biological Sciences, A.-Einstein-Str. 3, D-18051 Rostock, Germany

Received 1 June 2007; received in revised form 8 September 2007; accepted 10 September 2007

Available online 15 September 2007

Published in honor of Professor Joseph Wang's 60th birthday.

## Abstract

This communication reports about how single-stranded 136 base polymerase chain reaction (PCR) products labeled with electrochemically active osmium tetroxide bipyridine can be detected voltammetrically by hybridization with probe strands immobilized on gold electrodes. These electroactive ssDNA targets have been obtained by means of Lambda Exonuclease treatment of the double-stranded PCR products followed by hybridization of the remaining single strands with short protective strands and covalent labeling with osmium tetroxide bipyridine. Square-wave voltammetric signals of these osmium labels have been obtained only upon hybridization with the immobilized probe strands. An optimal 50 °C hybridization temperature has been found with a saturation of the probe layer at 30 min hybridization time and 7.5 nmol/l target concentration. The blank capture probe layer alone did not yield any signal. Unprotected strands produced almost no interference. Such double-selective switch-on electrochemical hybridization assays hold great promise for the specific detection of PCR products.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** PCR product; Protective strand; Osmium tetroxide bipyridine; Gold electrode; Probe SAM; DNA hybridization

## 1. Introduction

Nucleic acid-modified electrodes used as biosensors can detect the hybridization of two complementary DNA single strands (probe and target). This electrochemical transduction can be performed by means of molecules that are (a) covalently attached to the target, (b) interacting with the negatively charged phosphate groups or (c) intercalating into the base stack. It is also possible to make use of the intrinsic electrochemical activity of the DNA, e.g. the oxidation of guanine [1–3]. Magnetic beads [4,5] and self-assembled monolayers [6–12] are proven approaches to immobilize the probe strands. We recently reported about the application of covalently attached redox markers together with thiol-linked probe oligonucleotides on heated gold electrodes [13,14].

A few studies about the electrochemical detection of polymerase chain reaction (PCR) products have been published.

Methylene blue intercalates stronger into ssDNA (single-stranded DNA) than into dsDNA (double-stranded DNA). This has been used to detect the hybridization of PCR products with capture probes immobilized on carbon paste electrodes [15]. Upon successful hybridization, a diminished voltammetric methylene blue signal has been observed. In similar approaches, daunomycin [16,17] and Meldola's blue [18] have been used to detect PCR products electrochemically. Hybridization detection assays basing on intercalators and alike often suffer from small differences in the electrochemical signals obtained before and after target binding. Yet, this difference has to be taken as the hybridization indication.

The methods of electrochemical hybridization detection have been reviewed several times [19–23].

The complex [OsO<sub>4</sub>(bipy)] can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label [24]. It reacts with the pyrimidine bases thymine and cytosine [25] forming a diester of osmium(VI) acid in well-known manner under oxidation of the C–C-double bond in the pyrimidine ring. Labeling of DNA-strands of any length can be easily performed in the laboratory, which is an important advantage of this approach. However,

\* Corresponding author. Tel.: +49 381 4986470; fax: +49 381 4986461.  
E-mail address: [gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de](mailto:gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de) (G.-U. Flechsig).

only pyrimidine bases of single strands can be labeled this way. Such Os-modified DNA strands on the other hand are unable to form double strands, i.e. hybridization with probe oligos is no longer possible. These reactions have been investigated for about 25 years by Palecek et al. They showed that osmium tetroxide complexes could be utilized as strand selective probes which allow not only discriminating between single and double-stranded DNA but also studying the structure of double strands as well as sensitive detection of nucleic acids [26–29]. Until now, the steps of Os(VIII)-labeling, probe hybridization and electrochemical detection have been conducted in solution and at separate surfaces, respectively, especially by means of magnetic beads [30–34]. Such osmium tetroxide labeling had also been applied to detect oligo(dA)<sub>n</sub>-containing PCR products by means of thermal denaturation and magnetic separation [31,32].

Protective oligonucleotides are known from biochemical applications, where, e.g. DNA strands have to be protected against cleavage by nucleases [35]. Recently, we reported on how protective oligonucleotide strands can be utilized for labeling thymine-containing nucleic acids by means of [OsO<sub>4</sub>(bipy)] without losing their ability for hybridization reactions with immobilized oligonucleotide probes [36,37]. We applied this technique to compare the DNA hybridization on both heated ceramic-based and rotating gold disk electrodes [38]. Fojta et al. have (independently from us) reported about the use of protective oligonucleotides for the preparation of osmium tetroxide-labeled reporter strands by means of magnetic separation [39]. Here, we demonstrate that this new method can also be applied to detect the products of polymerase chain reactions (PCR). Such amplicons are generally obtained in the form of double strands. To ease the hybridization with the immobilized probe oligonucleotides, we removed one of the product strands by nuclease cleavage.

## 2. Experimental

### 2.1. Material

2,2'-Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide as a 2% aqueous solution from Fluka. The dithiol-modified DNA probe (*F-probe*) containing a (dT)<sub>15</sub>-spacer was delivered by Friz Biochem GmbH (Munich, Germany). The 136 mer *Fragment* was prepared as described below. The "Tris-buffer" contained 10 mmol/l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane and 0.5 mol/l sodium sulfate and was adjusted to pH 7.5 using sulfuric acid. The sequences of all DNA-strands together with their length and designations are given in Table 1. The *F-probe* oligonucleotide fits to a 27-base recognition site (underlined in Table 1) of the 136 base *Fragment*. The *F-protector* oligonucleotide contains 5 mismatches (underlined and bold in Table 1) to ease its later displacement by the immobilized *F-probe*.

### 2.2. PCR and Exonuclease treatment conditions

A synthetic 136-base-DNA (sequence from the genome of *Clostridium acetobutylicum* [1855609–1855744]) was used as template. The standard PCR reaction was performed with

Table 1  
DNA sequences

Designation	Length	Sequence
<i>Fragment</i>	136	5'- CTTACAGGAATTGTTTTGGGACTTGCAA GGGCTTTTGGAGAGGCATTAGCAGTTCAA ATGGTAATAGGT <u>AATACAGTAAAATCAG</u> CTCAAGGACTTTTTTCTCCTAC- TACCACTTTGACAAGCGTACTTACAATGG- 3'
<i>F-protector</i>	27	5'- <u>CAG TGT</u> TTG <u>ACC</u> TGA TTT TAC TGT <u>CTT</u> -3'
<i>F-probe</i>	27	5'-AAG TCC TTG AGC TGA TTT TAC TGT ATT- ttttttttttt-[Dithio] <sub>3</sub> -3'

100 ng of template DNA, 0.4 μM dNTPs, 0.5 μM of the primers C.aceto F and C.aceto Rp (Table 2) and 2.5 U Sawady-Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in 50 μl reaction volume according to the manufacturer's instructions. While synthetic primers are normally not phosphorylated on their 5'-end (according to natural DNA), the primer C.aceto Rp was 5'-phosphorylated for later recognition by the exonuclease to allow cleavage of only this strand. The enzymatic hydrolysis of the phosphorylated strand of the DNA was performed using 15 U of Lambda Exonuclease (NEB GmbH, Frankfurt a.M., Germany), which has the highest selectivity for 5'-end phosphorylated DNA, in 1 × Lambda Exonuclease buffer for 1 h at 37 °C. During this step, the phosphorylated strand was recognized by the exonuclease and (at least in theory) completely removed from the PCR product's double strand releasing a single strand. We will show in the next section that the yield of this process was not 100%. The enzyme was heat-inactivated after the reaction for 10 min at 75 °C. Best results in the voltammetric experiments were achieved when the DNA was purified after that using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) with 4 volumes of NTC buffer or the innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany) according to the manufacturer's instructions. This purified mainly single-stranded PCR product called *Fragment* has been used in the following steps. All DNA concentrations were evaluated visually in the agarose gel (2%, w/v) using the DNA-marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Germany) as a comparison.

### 2.3. Modification of *Fragment* oligonucleotide

The *Fragment* at its maximum concentration (between 25 and 250 nmol/l) and the protective strand *F-protector* (10 μmol/l) in at least ten-fold excess were mixed and left for 2 h at room temperature to allow hybridization. In one control experiment, the protective strand has not been added. A Tris-buffer solution

Table 2  
Primers

	Sequence: 5'-3'	
C.aceto F	CTTACAGGAATTGTTTTGGGA	Forward primer
C.aceto Rp	p CCATTGTAAGTACGCTTGTC	Reverse primer

containing 10 mmol/l osmium tetroxide and 10 mmol/l 2,2'-bipyridine (forming  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ ) was then added and left at room temperature for 2 h. After this period, the excess of the osmium complex was removed by dialysis against pure Tris-buffer by means of Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 3500 MWCO (Rockford, IL, USA) at 4 °C for 19 h. This solution (containing the osmium-labeled target *Fragment*) was used for the hybridization experiments.

#### 2.4. Preparation of SAM-modified gold electrodes

The gold disk electrode (Metrohm, Switzerland) was first polished using corundum 0.3  $\mu\text{m}$  and then electrochemically treated by means of 25 voltammetric cycles between  $-0.2$  and  $+1.65$  V at 100 mV/s in 0.5 M sulfuric acid. After rinsing with water, one droplet of 15  $\mu\text{l}$  *F-probe* (30.3  $\mu\text{mol/l}$ ) solution was given onto the dried electrode and left overnight (16 h) at 10 °C in a water-saturated atmosphere allowing the formation of the probe-SAM. After this, the electrode was soaked for 1 h in 1 mmol/l aqueous mercaptohexanol solution.

#### 2.5. Hybridization and dehybridization procedure

During the hybridization step, the rotating gold disk electrode was dipped in a beaker containing the target (*Fragment*) solution and adjusted to 1000 rpm. After this the electrode was rinsed with Tris-buffer. To regenerate the probe-SAM by dehybridization, the electrode was immersed in 50 °C water for 60 s.

#### 2.6. Electrochemical measurements

For all electrochemical procedures, an Autolab PSTAT10 (ecochemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by a PC with GPES 4.8 software and an electrode stand inside a *Faraday* cage together with a Ag/AgCl (3 mol/l KCl) reference electrode and a glassy carbon counter electrode (all from Metrohm AG, Herisau, Switzerland) was used. The parameters for square-wave voltammetry were 200 Hz, 40 mV amplitude. The scan was performed from  $-0.55$  to 0.0 V. All measurements were conducted at room temperature in Tris-buffer. The peak-shaped signals were smoothed and baseline-corrected. Automatic peak search was applied.

### 3. Results and discussion

The PCR and Lambda Exonuclease treatment were performed as described above. For a successful electrochemical detection without disturbances of hybridization of probe and target, we chose a sequence with a low ability to form stable secondary structures. The results of PCR and Lambda Exonuclease treatment are displayed in Fig. 1. In lane 1, the molecular marker was applied, in lane 2, the product of the PCR before Lambda Exonuclease treatment and in lane 3, the PCR-product after Lambda Exonuclease treatment is shown. It can be seen that the PCR resulted in a single band, which is then partially digested after the Lambda Exonuclease treatment. The ssDNA shows a different running behavior in the gel. Such changed

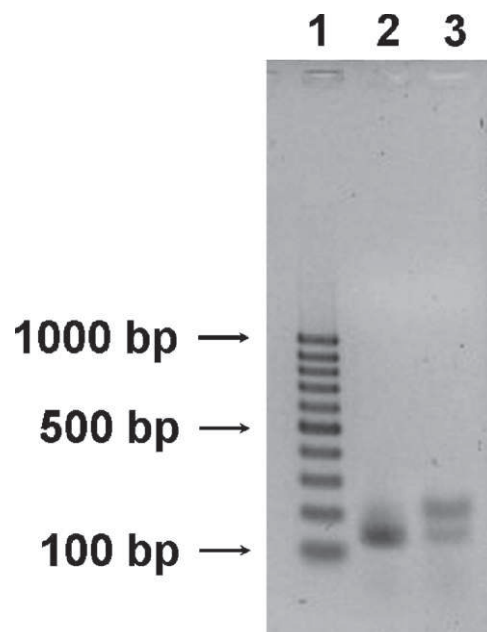


Fig. 1. Two percent (w/v) agarose gel stained with Gelred (Cambridge Bio-Science, UK): lane 1, Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (0.3  $\mu\text{g}$ ); lane 2, 2  $\mu\text{l}$  PCR-product (136 bp-*Fragment*); lane 3, 5  $\mu\text{l}$  PCR-product after Lambda Exonuclease treatment.

interactions with the agarose gel can be attributed to a different ternary structure of ssDNA, which is bulkier compared to dsDNA, which is more stretched. A major fraction of the PCR product has been digested to the single-stranded form; however, the yield of this process was not 100%. We found the same pattern of ssDNA and dsDNA bands in PCR-products obtained by asymmetric PCR without any exonuclease being involved. These results will be the subject of a follow-up paper.

Fig. 2 depicts square-wave voltammograms representing the detection of the single-stranded PCR product together with different controls. The large voltammetric signal of the osmium tetroxide bipyridine-labeled PCR product (Fig. 2c) indicates not

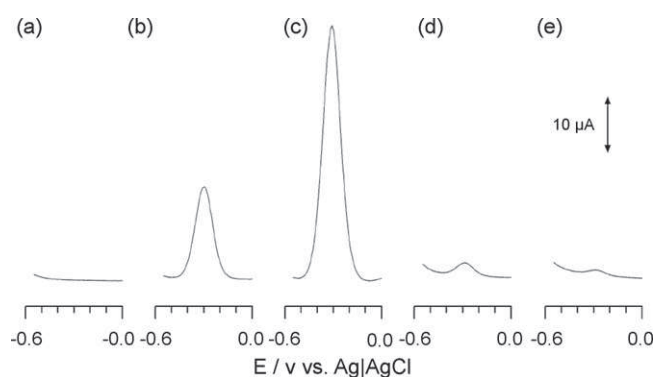


Fig. 2. Square-wave voltammograms at gold disk electrodes in Tris-buffer with immobilized probe strands, (a) *F-probe* not hybridized, (b) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 23 °C, (c) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 50 °C, (d) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 23 °C, modification and hybridization without protecting strand and (e) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 50 °C, modification and hybridization without protecting strand; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV; stirring at 1000 rpm during hybridization.

only good hybridization efficiency with the immobilized capture probe at 50 °C, but also effective signal amplification due to multiple labeling. Each unprotected thymine base is able to react with one [OsO<sub>4</sub>(bipy)], each delivering two electrons during the voltammetric scan. At 23 °C hybridization temperature (Fig. 2b), the signal attains less than half the value compared to 50 °C. This can probably be addressed to hindered exchange of the protective strand by the immobilized capture probe.

Fojta et al. did not include base mismatches into the protective strand, since it had been magnetically separated from the target strand after the osmium tetroxide modification [39]. However, immobilization of the target or protective strand is required instead. Future investigations will reveal how many mismatches between protective and target strand are necessary to allow easy in situ replacement of the protective strand by the immobilized probe.

The capture probe (*F-probe*) alone (Fig. 2a) did not yield any signal. Although, the unprotected and, hence, thoroughly [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-modified *Fragment* gave a very small signal at room temperature (Fig. 2d), this response could be significantly suppressed by applying an elevated hybridization temperature of 50 °C (Fig. 2e). Such minimal electrochemical response can probably be attributed to either unspecific adsorption of the target to the electrode surface or weak hybridization interactions between probe and target strands. In both cases, elevated temperature is expected to diminish the binding.

We further investigated the effect of hybridization temperature. Fig. 3 illustrates that elevated hybridization temperature has a positive effect up to 50 °C. At even higher temperature, the signal levels off.

In contrast, earlier investigations resulted in an optimal hybridization temperature between 30 and 40 °C [36–38]. The different behavior found in this study can probably be attributed to longer protective strands and capture probes (27 bases each, compared to 20 in the earlier studies). At temperatures higher than 70 °C, we expect disruption of the probe layer resulting at least in a loss of hybridization capability, as we observed earlier [13].

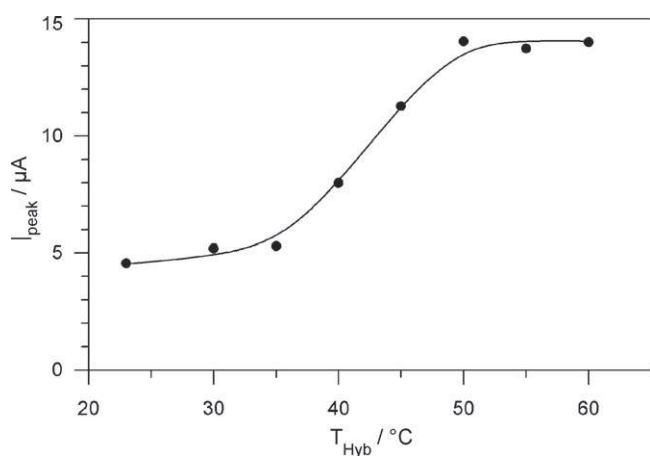


Fig. 3. Dependence of the square-wave voltammetric signals on the hybridization temperature, *F-probe*-SAM 15 min hybridized with 7.5 nmol/l target (*Fragment*). Other conditions as in Fig. 2.

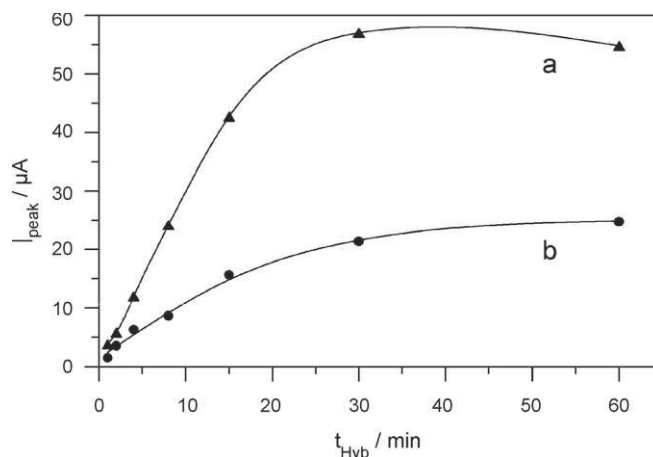


Fig. 4. Effect of the hybridization time of immobilized *F-probe* with 7.5 nmol/l target (*Fragment*) at (a) 50 and (b) 23 °C hybridization temperature. Other conditions as in Fig. 2.

Fig. 4 exhibits the effect of hybridization time upon the voltammetric signals at two different temperatures. According to Fig. 2b and c, we observed better hybridization efficiency at elevated temperature. This leads to a faster saturation of the immobilized probe layer. Even at 60 min hybridization at 23 °C, we obtained only half of the maximum signal compared to 30 min at 50 °C. Such thermal hybridization acceleration is more effective than mechanical treatment alone [38].

#### 4. Conclusions

Single-stranded PCR products labeled with electrochemically active osmium tetroxide bipyridine can be detected voltammetrically by hybridization with probe strands immobilized at gold electrodes. Such ssDNA targets can be obtained by means of Lambda Exonuclease treatment followed by hybridization with short protective strands and covalent labeling with osmium tetroxide bipyridine. Square-wave voltammetric signals of these osmium labels are obtained only upon hybridization. An optimal 50 °C hybridization temperature has been found with a saturation of the probe layer after 30 min hybridization time at 7.5 nmol/l target concentration. The blank capture probe layer alone did not yield any signal. Unprotected strands produced almost no interference. Such double-selective switch-on electrochemical hybridization assays hold great promise for the specific detection of PCR products.

#### Congratulation

Gerd-Uwe Flechsig likes to congratulate Professor Joseph Wang in the occasion of his 60th birthday wishing him all the best.



## Acknowledgement

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support (Fl 384/2-1, 2-3).

## References

- [1] J. Wang, G. Rivas, J.R. Fernandes, J.L.L. Paz, M. Jiang, R. Waymire, *Anal. Chim. Acta* 375 (1998) 197.
- [2] J. Wang, A.N. Kawde, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 219.
- [3] J. Wang, A.N. Kawde, A. Erdem, M. Salazar, *Analyst* 126 (2001) 2020.
- [4] J. Wang, R. Polsky, D.K. Xu, *Langmuir* 17 (2001) 5739.
- [5] J. Wang, D.K. Xu, A.N. Kawde, R. Polsky, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5576.
- [6] T.M. Herne, M.J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 8916.
- [7] S.O. Kelley, N.M. Jackson, M.G. Hill, J.K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 38 (1999) 941.
- [8] S.O. Kelley, E.M. Boon, J.K. Barton, N.M. Jackson, M.G. Hill, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 4830.
- [9] E.M. Boon, D.M. Ceres, T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 1096.
- [10] E.M. Boon, J.K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002) 320.
- [11] E.L.S. Wong, F.J. Mearns, J.J. Gooding, *Sens. Actuator B: Chem.* 111 (2005) 515.
- [12] E.L.S. Wong, J.J. Gooding, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2138.
- [13] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, *Langmuir* 21 (2005) 7848.
- [14] G.-U. Flechsig, J. Peter, K. Voss, P. Gründler, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 1059.
- [15] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, S. Erensoy, U.S. Akarca, M. Mascini, M. Ozsoz, *Talanta* 56 (2002) 837.
- [16] G. Marrazza, G. Chiti, M. Mascini, M. Anichini, *Clin. Chem.* 46 (2000) 31.
- [17] M. Minunni, S. Tombelli, E. Mariotti, M. Mascini, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 589.
- [18] K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, H. Karadeniz, Z. Ozkan, A. Erdem, F. Jelen, M. Ozsoz, *Türk. J. Chem.* 28 (2004) 523.
- [19] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 63.
- [20] E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 261.
- [21] J.J. Gooding, *Electroanalysis* 14 (2002) 1149.
- [22] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1192.
- [23] P. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 104.
- [24] E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.* 73 (2001) 74A.
- [25] E. Palecek, *Methods Enzymol.* 212 (1992) 139.
- [26] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8 (1981) 497.
- [27] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* 1 (1982) 53.
- [28] E. Palecek, M.A. Hung, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 236.
- [29] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* 3 (1984) 175.
- [30] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 85.
- [31] M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik, R. Kizek, *Electroanalysis* 15 (2003) 431.
- [32] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova, E. Palecek, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6532.
- [33] P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova, M. Fojta, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 245.
- [34] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, *Electroanalysis* 18 (2006) 186.
- [35] G. Wang, L. Wu, X. Wang, J. Cheng, W. Yang, *Int. Patent Application WO 02/16647 A1* (2000).
- [36] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Patent DE 10 2005 039 726 B3* (2005).
- [37] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2125.
- [38] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* 19 (2007) 1356.
- [39] M. Fojta, P. Kostecka, M. Trefulka, L. Havran, E. Palecek, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1022.

### **Publikation 3**

Mix M, Reske T, Duwensee H, Flechsig G-U: Electrochemical detection of asymmetric PCR products by labeling with osmium tetroxide. *Electroanalysis* 21 (7); 2009; 826-830

(DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200804493>)



## Full Paper

# Electrochemical Detection of Asymmetric PCR Products by Labeling with Osmium Tetroxide

Maren Mix, Thomas Reske, Heiko Duwensee, Gerd-Uwe Flechsig\*

University of Rostock, Department of Chemistry, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock, Germany

\*e-mail: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de

Received: October 13, 2008

Accepted: December 25, 2008

## Abstract

Single stranded DNA-targets from asymmetric polymerase chain reaction (PCR) of a sequence of the gram positive, spore forming bacterium *Clostridium acetobutylicum* were detected by square-wave voltammetry after labeling with osmium tetroxide bipyridine and hybridization with DNA capture probes immobilized on gold electrodes. The asymmetric PCR, performed with a 10-fold excess of the forward-primer, was used without any further purification for hybridization with protective strands and covalent labeling with osmium tetroxide bipyridine. Square-wave voltammetric signals of 20 nmol/L targets were significantly higher at 50 °C compared with 23 °C hybridization temperature. A fully noncomplementary protective strand yielded thoroughly modified targets unable for further hybridization. Coupling this with thermal discrimination opens new opportunities for sequence specific DNA detection.

**Keywords:** Asymmetric polymerase chain reaction, PCR, Square-wave voltammetry (SWV), Osmium tetroxide bipyridine, Covalent DNA label, Electrochemical hybridization detection

DOI: 10.1002/elan.200804493

## 1. Introduction

In the recent decade one could observe a dramatically increased publishing activity in the area of electrochemical DNA detection. It was shown that the detection of hybridization of two complementary DNA single strands (probe and target) could not only be achieved by classic molecular biological methods such as Northern or Southern Blots or optical microarrays but also by nucleic acid-modified electrochemical biosensors. The electrochemical transduction can be performed by molecules that are either covalently attached to the target, interacting with the negatively charged phosphate groups or intercalating into the base stack. It is also possible to make use of the intrinsic electrochemical activity of the DNA, e.g., the oxidation of guanine [1].

Most common for the immobilization of probe strands are magnetic beads and self-assembled monolayers [2]. We recently reported about the application of covalently attached redox markers together with thiol-linked probe oligonucleotides on heated gold electrodes [3].

In other publications the electrochemical detection of PCR-products was performed with methylene blue [4, 5] or sandwich hybridization with an alkaline phosphatase conjugate on biotinylated signaling probes [6]. One of the problems of hybridization detection basing on intercalators is that only the (often small) difference of the electrochemical response before and after target binding has to be taken as the hybridization signal. The methods of electro-

chemical hybridization detection have been reviewed many times [7–15].

The complex  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label. It reacts rapidly with the pyrimidine base thymine and less quickly with cytosine [16] forming a diester of osmic(VI) acid in well-known manner under oxidation of the C-C-double bond in the pyrimidine ring. These reactions have been investigated for about 25 years by Palecek et al. [17–20]. One of the main advantages of this approach is that the labeling of DNA-strands of any length can be easily performed in the laboratory. However, only pyrimidine bases of single strands can be labeled this way. Such Os-modified DNA strands on the other hand are unable to form double strands, i.e. hybridization with probe oligos is no longer possible. Until now, the steps of Os(VIII)-labeling, probe hybridization, and electrochemical detection have been conducted in solution and at separate surfaces, respectively, especially by means of magnetic beads [21–25]. Since only ss-DNA can be labeled by means of  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ , protective partially complementary oligonucleotides (which can be replaced later by the fully complementary capture probe) have to be used for the labeling process. Protective oligonucleotides are known from biochemical applications, where, e.g., DNA strands have to be protected against cleavage by nucleases [26]. Recently, we reported about how protective oligonucleotide strands can be utilized for labeling thymine-containing nucleic acids by means of  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  without losing their ability for

Table 1. DNA sequences, the mismatches in the protective strand are highlighted.

Designation	Length	Sequence
<i>Fragment</i>	136	5'-CTTACAGGAATTGTTTGGGACTTGCAAGGGCTT-TTGGAGAGGCATTAGCAGTT-CAAATGGTAATAGGTA-ATACAGTAAAATCAGCTCAAGGACTTTTTTCTCCTAC-TAC-CACCTTGACAAGCGTACTTACAATGG -3'
<i>F-protector</i>	27	5'-AAG <u>AGC</u> ATGAGCTGATTTA <u>GTG</u> AATT-3'
<i>F-probe</i>	27	5'-AAGTCCTTGAGCTGATTTACTGTATT-TTTTTTTTTTTTTT[Dithio] <sub>3</sub> -3'
<i>PI-protector</i>	32	5'-GCCTCTTATAGTTATCAGGATCCATTTTGG-3'

hybridization reactions with immobilized oligonucleotide capture probes [27–29].

The electrochemical detection of DNA-sequences amplified by PCR (polymerase chain reaction) has been described in a couple of publications in the last few years. In most cases the template is amplified by symmetric PCR. Before any electrochemical hybridization measurement with the PCR product can be performed, a denaturation step is necessary to separate the double strand (produced during the PCR) into two single strands. We recently reported on the treatment of symmetric PCR products with Lambda Exonuclease to remove one DNA strand [29].

We think it is favorable if electrochemical signals are only obtained upon positive detection, and especially if a blank sample does not yield any response. This seems to be much more reliable than other procedures described earlier delivering either a decrease of the signal in case of a positive detection [30], or an increase of a signal which is already present without any target DNA [31]. Furthermore, time-consuming cleaning steps are often needed [32, 33]. Cost is another concern to be considered. Expensive, though frequently used, materials include magnetic beads, biotinylated primers, digoxigenin-labeled sequences or antibodies [34–36]. A promising detection protocol is symmetric PCR with ferrocene-labeled dUTP as suggested by Hsing et al. [37]. However, the synthesis of the ferrocene-labeled dUTP seems to be time-consuming and complicated. Another possibility is the detection of hybridization based on an enzyme-linked assay [38].

There are only a few reports on the electrochemical detection of asymmetric PCR-products [39, 40]. To our knowledge, these methods suffer from some of the problems mentioned above or do not have desirable detection limits. The main problem here is limited efficiency of asymmetric PCR.

Here, we demonstrate that osmium tetroxide bipyridine can also be applied to detect the products of asymmetric polymerase chain reactions on gold electrodes modified with capture probes. The used model sequence was randomly chosen from a bacterium used in molecular biology as a model organism for non human-pathogenic Clostridia. Usually, PCR amplicons are obtained in form of double strands. By raising the concentration of one primer, the (now asymmetric) PCR yields ssDNA besides dsDNA. This mixed product was used in the experiments without further purification.

## 2. Experimental

2,2'-Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide as a 2% aqueous solution was obtained from Fluka. All DNA oligo nucleotides (*probes, targets and protector strands*) were delivered by Friz Biochem GmbH (Munich, Germany). The "Tris-buffer" (containing 10 mmol/L tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Fluka) and 0.5 mol/L sodium sulfate (Fluka)) was adjusted to pH 7.5 using sulfuric acid. The latter was used instead of HCl to avoid chloride, which is suspected to form various gold chlorides on the working electrode's surface disturbing formation/durability of SAMs. Table 1 lists the sequences of all DNA-strands together with their length and designations used in this paper. The *F-protector* oligonucleotides were designed to have 5 mismatches (underlined in Table 1) to facilitate their later displacement by the immobilized *F-probe*. Highly purified water (18 MΩ cm, TOC < 2 ppb) prepared by means of a system form SG Water (Barsbüttel, Germany) was used throughout.

### 2.1. Preparation of SAM-Modified Gold Electrodes

First, the gold disk electrode (Metrohm, Switzerland) was polished using corundum 0.3 μm (Buehler) and rinsed thoroughly with water. It was then electrochemically treated by means of 25 voltammetric cycles between –0.2 and +1.65 V at 100 mV/s in 0.5 M sulfuric acid. The electrode was rinsed with water before one droplet of 15 μL *F-probe* solution (30.3 μmol/L) was placed onto the electrode surface in order to form the capture probe SAM. After 16 h at 10 °C in a water-saturated atmosphere, the electrode was rinsed and immersed in 1 mmol/L aqueous mercaptohexanol solution for one hour.

### 2.2. Hybridization and Dehybridization Procedure

For the hybridization step, the probe-SAM-modified gold disk electrode was dipped into a beaker containing the target solution. The solution was stirred constantly using a magnetic stirrer. Heating of the sample solution was conducted by means of a water bath. After the hybridization, the electrode was rinsed with Tris-buffer.

Following the electrochemical measurement, the electrode was regenerated by a dehybridization step. To retrieve the probe-SAM back, the electrode was immersed in 50 °C deionized water for 60 s.

### 2.3. Electrochemical Measurements

For all electrochemical procedures, an Autolab PSTAT10 (Ecochemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by a PC with GPES 4.8 software and an electrode stand inside a Faraday cage was used together with a Ag/AgCl (3 mol/L KCl) reference electrode and a glassy carbon counter electrode (all from Metrohm AG, Herisau, Switzerland). The parameters for square-wave voltammetry were 200 Hz and 40 mV amplitude. The scan was performed from –0.55 to 0.0 V. All measurements were performed at room temperature in Tris-buffer. The peak-shaped signals were smoothed by means of a Savitzky and Golay filter (level 3) and baseline-corrected (moving average, peak width 0.03).

### 2.4. PCR Conditions

A synthetic 136-base-DNA strand (sequence from the genome of *Clostridium acetobutylicum* [1855609–1855744]) was used as the template. The asymmetric PCR was performed with 100 ng of template DNA, 0.4 μM dNTPs, 1 μM of the primer C.aceto F and 0.1 μM C.aceto R (Table 2), and 2.5 U Sawady-Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in 50 μL reaction volume according to the manufacturer's instructions. In case of the symmetric PCR an equal amount of the primers was used (0.5 μM). The PCR was performed with the following parameters: 1 × 94 °C, 2 min; 30 × (94 °C, 30 s, 57 °C, 45 s, 72 °C, 30 s); 1 × 72 °C, 7 min. The agarose gelelectrophoresis was performed with a 2% [w/v] agarose gel in 1 × TAE-buffer (40 mM tris-(hydroxymethyl)-amino-methane, 20 mM glacial acetic acid, 1 mM EDTA) for 45 min at 80 V. The gels were stained with Gelred (Cambridge BioScience, UK) for 30 min and visualized on a Transilluminator UST-20M-8PC (Biostep, Jahnsdorf, Germany) under a Darkhood DH-40/50 (Biostep, Jahnsdorf, Germany) and photographed with an Olympus C-7070 digital camera with an Ethidiumbromide-filter (540–640 nm). All DNA-concentrations were evaluated visually in the agarose gel (2% [w/v]) using the DNA-ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Germany) as a comparison.

Table 2. Primers.

Sequence: 5'-3'		
C.aceto F	CTTACAGGAATTGTTTTGGGA	forward primer
C.aceto R	CCATTGTAAGTACGCTTGCA	reverse primer

### 2.5. Modification of Fragment Oligonucleotide (Target)

For the modification, 200 μL of PCR-solution (containing the single target strand *Fragment*) were used without further purification. The *Fragment* at its maximum concentration (ca. 20 nmol/L) and the protective strand *F-Protector* (10 μmol/L in the hybridization solution) were mixed and left for two hours at room temperature to allow hybridization. A solution containing 10 mmol/L osmium tetroxide and 10 mmol/L 2,2'-bipyridine (forming [OsO<sub>4</sub>(bipy)]) was then added and left at room temperature for 2 hours. After this period the excess of the osmium complex was removed by dialysis against pure Tris-buffer by means of Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 3500 MWCO (Rockford, IL, USA) at 4 °C for 19 hours. After the dialysis, the purified solution (containing the osmium-labeled target *Fragment*) was used for the hybridization experiments.

### 3. Results and Discussion

Figure 1 displays gel electrophoretic analysis of symmetric (lanes 2 and 3) and asymmetric (lanes 4 and 5) PCR products. While classic symmetric PCR provides an optimal yield of the double stranded amplicon, asymmetric PCR is usually prone to limited efficiency. However, this variant also yields ssDNA, which is visible on the gel above the dsDNA. Excess primers can be found right below the dsDNA bands. The DNA ladder can be applied only for dsDNA, since ssDNA (primers and products) shows a different running behavior in the gel. The single strands can be used directly for further modification or hybridization steps. Here, we used the asymmetric PCR products for labeling with osmium tetroxide bipyridine. As described earlier [27], the single stranded target DNA is first hybridized with a protective strand in order to preserve an unmodified recognition site for later capturing by immobilized probes. The latter event has been detected by square-wave voltammetry as depicted in Figure 2. While a blank capture probe layer does not show any voltammetric response (Fig. 2a), we found a large reversible peak at –0.29 V (vs. Ag/AgCl|3 mol/L KCl) for the hybridization of the immobilized capture probe with the [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-modified asymmetric PCR product (Fig. 2b, c). This peak is caused by the reversible redox couple osmium (IV/VI) according to earlier findings of Lukasova et al. [18], as well as results of Crowell et al. and Meites [41, 42]. The reduction of Os(VIII) happens at 0 V and the reduction of Os(IV) to Os(III) at ca. –1.1 V. We found that the voltammetric response can be doubled if hybridization solution temperature is increased from 23 to 50 °C. In contrast, we observed a much smaller peak upon hybridization of the same PCR product after protection with the noncomplementary *PI-protector* (Fig. 2d, e). In this case, a stringent hybridization temperature (50 °C) leads to a diminished contribution of the thoroughly labeled and, hence, nonspecific DNA. The latter is discriminated only during hybridization with the protective strand. By using a noncomplementary protective

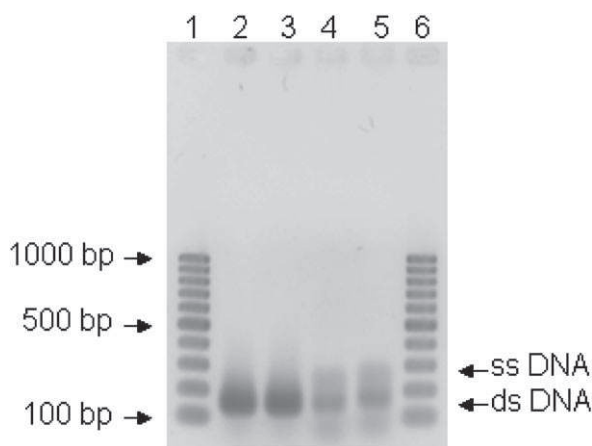


Fig. 1. 2% [w/v] agarose gel stained with Gelred (Cambridge BioScience, UK); lane 1 + 6: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (0.3  $\mu$ g), lane 2 + 3: 2  $\mu$ L symmetric PCR-product (136 bp-fragment), lane 4 + 5: 5  $\mu$ L asymmetric PCR-product (136 bp-fragment in lower band and 136 b-fragment in higher band)

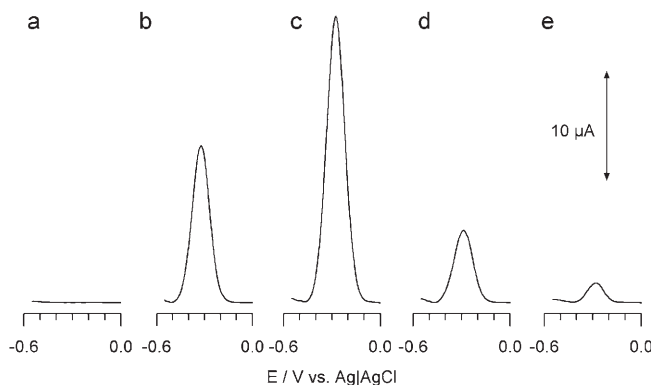


Fig. 2. Square-wave voltammetric signals at gold disk electrodes in Tris-buffer with immobilized probe strands, a) *F-probe* not hybridized at 23°C, b) *F-probe* 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labeled *Fragment* at 23°C, c) *F-probe* 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labeled *Fragment* at 50°C, d) *F-probe* 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labeled *Fragment* at 23°C, modification of the *Fragment* with noncomplementary protecting strand *PI-protector* and (e) *F-probe* 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labeled *Fragment* at 50°C, modification of the *Fragment* with noncomplementary protecting strand *PI-protector*; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV; stirring during the hybridization step at 1000 rpm.

strand, the protection widely fails and causes labeling of the entire target strands (i.e. pyrimidine bases therein) leaving no intact recognition sites.

Figure 3 displays the effect of hybridization time upon the square-wave voltammetric response of the [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-label at 23 and 50°C. Whereas a beginning saturation of the capture probe layer can be observed after 30 min. at 23°C, the hybridization process does not appear finished at 50°C, even after 60 min. Capture probe availability and hence, hybridization efficiency seems significantly better at elevated hybridization temperature due to dissolving of

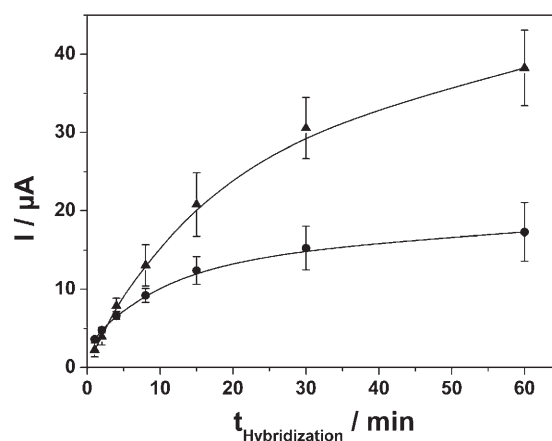


Fig. 3. Effect of the hybridization time of immobilized *F-Probe* with 20 nmol/L target (*Fragment*) at a) 50 and b) 23°C hybridization temperature. The error bars indicate the standard deviation of 3 independent hybridization-dehybridization series, each performed with a newly prepared probe-SAM. Other conditions were the same as in Figure 2.

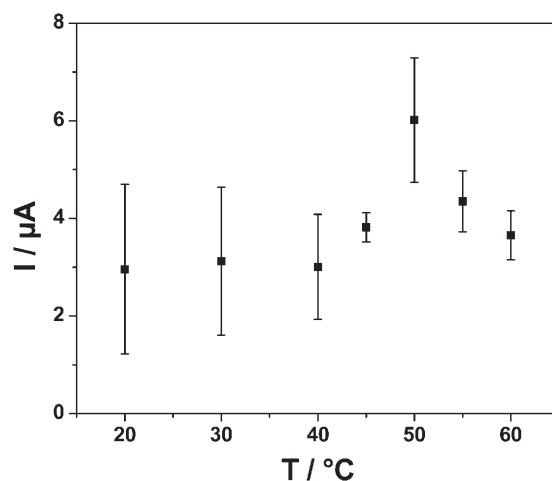


Fig. 4. Dependence of the square-wave voltammetric signals on the hybridization temperature, *F-Probe-SAM* 5 min hybridized with 20 nmol/L target (*Fragment*). The error bars indicate the standard deviation of 3 independent PCR runs and hybridization-dehybridization series, each performed with a newly prepared probe-SAM. Other conditions were the same as in Figure 2.

secondary structures of the capture probe and an accelerated reaction between capture probe and target. Obviously, the saturation level is at least twice as high comparing 50 and 23°C hybridization experiments. The effect is similar to what we have found earlier when we treated symmetric PCR products with Lambda Exonuclease to remove one DNA strand [29].

Figure 4 exhibits the effect of hybridization temperature upon the voltammetric signals of the [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-label following a 5 min. hybridization period. Even after this short hybridization time, good signal height of several  $\mu$ A is achieved. The observed temperature effect is comparable to

longer hybridization periods (Fig. 3). Above 50 °C, a signal decrease is observed, presumably due to double strand melting (the melting temperature is 55 °C according to oligonucleotide calculation programs). This indicates that 50 °C is indeed the optimal stringent hybridization temperature. Although the absolute signal level of different PCR runs and different hybridization–dehybridization series is subject to fluctuations as indicated by the error bars in Figure 4, the average signals as well as the trend in each series are well reproducible. The reason for these fluctuations can be found in variations of the surface coverage with probe strands. This can be compensated by calibration. Furthermore, the simple symmetric and asymmetric PCR protocols are known as qualitative amplification methods. They are not well suited for quantification. Future development will lead to quantitative real-time PCR with electrochemical detection.

#### 4. Conclusions

Asymmetric PCR products contain single stranded target strands, which can easily be modified using covalent [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labels. Protective strands preserve a recognition site of the target for later hybridization with immobilized capture probes on gold electrodes. The redox couple osmium (IV/VI) of the [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labels yields large reversible square-wave voltammetric signals. Discrimination of noncomplementary DNA is possible even by hybridization with the protective strand. This opens a route towards double discrimination by consecutive stringent hybridization with both protective and capture probes allowing selective determination of DNA sequences even in presence of a large excess of fully noncomplementary or mismatched DNA.

#### 5. Acknowledgements

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG projects FL 384/4-2, 7-1, and 8-1) and to the State of Mecklenburg-Vorpommern (Excellence Funding Program) for financial support.

#### 6. References

- [1] M. Ravera, G. Bagni, M. Mascini, D. Osella, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2007**, Article ID 91078
- [2] E. Palecek, M. Fojta, *Talanta* **2007**, *74*, 276.
- [3] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1356.
- [4] R. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, K. W. Plaxco, A. L. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 4017.
- [5] O. Paenke, A. Kirbs, F. Lisdat, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2656.
- [6] F. Bettazzi, F. Lucarelli, I. Palchetti, F. Berti, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *614*, 93.
- [7] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 63.
- [8] E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, *32*, 261.
- [9] J. J. Gooding, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1149.
- [10] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192.
- [11] P. de-los-Santos-Alvarez, M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 104.
- [12] E. Palecek, M. Fojta, *Talanta* **2007**, *74*, 276.
- [13] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *609*, 139.
- [14] B. J. Privett, J. H. Shin, M. H. Schoenfish, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4499.
- [15] S. Cosnier, P. Mailley, *Analyst* **2008**, *133*, 984.
- [16] E. Palecek, *Meth. Enzymol.* **1992**, *212*, 139.
- [17] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, *8*, 497.
- [18] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, *1*, 53.
- [19] E. Palecek, M. A. Hung, *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 236.
- [20] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1984**, *3*, 175.
- [21] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 85.
- [22] M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik, R. Kizek, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 431.
- [23] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova, E. Palecek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6532.
- [24] P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova, M. Fojta, *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 245.
- [25] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 186.
- [26] G. Wang, L. Wu, X. Wang, J. Cheng, W. Yang, *Int. Patent Application WO 02/16647 A1* **2000**.
- [27] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2125.
- [28] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Patent DE 10 2005 039 726 B3* **2005**.
- [29] T. Reske, M. Mix, H. Bahl, G.-U. Flechsig, *Talanta* **2007**, *74*, 393.
- [30] Y. Ren, K. Jiao, G. Xu, W. Sun, H. Gao, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 2182.
- [31] P. Kara, S. Cavdar, A. Berdeli, M. Ozsoz, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1875.
- [32] P. Kara, B. Meric, A. Zeytinoglu, M. Ozsoz, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *518*, 69.
- [33] K. Kerman, D. Özkan, P. Kara, H. Karadeniz, Z. Özkan, A. Erdem, F. Jelen, M. Özsoz, *Turk. J. Chem.* **2004**, *28*, 523.
- [34] T. M.-H. Lee, M. C. Carles, I.-M. Hsing, *Lab Chip* **2003**, *3*, 100.
- [35] L.-L. Li, H. Cai, T. M.-H. Lee, J. Barford, I.-M. Hsing, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 81.
- [36] A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Hernández, S. Alegret, M. I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2010.
- [37] S. S. W. Yeung, T. M. H. Lee, I.-M. Hsing, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 363.
- [38] P. Horakova-Brazdilova, M. Fojtova, K. Vytras, M. Fojta, *Sensors* **2008**, *8*, 193.
- [39] R. Y. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, H. T. Soh, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 4017.
- [40] T. M.-H. Lee, I.-M. Hsing, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5057.
- [41] W. R. Crowell, J. Heyrovsky, D. W. Engelkemier, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 2888.
- [42] Meites, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4631.

## **Publikation 4**

Duwensee H, Mix M, Stubbe M, Adler M, Gimsa J, Flechsig G-U: Electrochemical Product Detection of an Asymmetric Convective Polymerase Chain Reaction. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2); 2009; 400-405

(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2009.07.025>)



Contents lists available at ScienceDirect

## Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)

## Electrochemical product detection of an asymmetric convective polymerase chain reaction

Heiko Duwensee<sup>a,d</sup>, Maren Mix<sup>a</sup>, Marco Stubbe<sup>b</sup>, Jan Gimsa<sup>b</sup>, Marcel Adler<sup>c</sup>, Gerd-Uwe Flechsig<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Rostock, Department of Chemistry, Albert-Einstein-Street 3a, 18051 Rostock, Germany

<sup>b</sup> University of Rostock, Chair of Biophysics, Department of Biological Sciences, Gertrudenstrasse 11a, 18057 Rostock, Germany

<sup>c</sup> Research Institute for the Biology of Farm Animals (FBN), Research Unit Molecular Biology, 18196 Dummerstorf, Germany

<sup>d</sup> Gensoric GmbH, Schillingallee 68, 18057 Rostock, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 May 2009

Received in revised form 16 July 2009

Accepted 23 July 2009

Available online 3 August 2009

#### Keywords:

Heated platinum wire

Asymmetric thermo-convective PCR

Thermal simulation

Fluid flow simulation

Osmium tetroxide bipyridine

Voltammetric hybridization detection

### ABSTRACT

For the first time, we describe the application of heated microwires for an asymmetric convective polymerase chain reaction (PCR) in a modified PCR tube in a small volume. The partly single-stranded product was labeled with the electrochemically active compound osmium tetroxide bipyridine using a partially complementary protective strand with five mismatches compared to the single-stranded product. The labeled product could be successfully detected at a gold electrode modified with a complementary single-stranded capture probe immobilized via a thiol-linker. Our simple thermo-convective PCR yielded electrochemically detectable products after only 5–10 min. A significant discrimination between complementary and non-complementary target was possible using different immobilized capture probes. The total product yield was approx. half the amount of the classical thermocycler PCR. Numerical simulations describing the thermally driven convective PCR explain the received data. Discrimination between complementary capture probes and non-complementary capture probes was performed using square-wave voltammetry. The coupling of asymmetric thermo-convective PCR with electrochemical detection is very promising for future compact DNA sensor devices.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The polymerase chain reaction (PCR) is a powerful tool for the detection of germs, genetic diseases or genetically modified plants in molecular biology. Several different approaches have been described to miniaturize the PCR system, besides the commonly used thermocyclers. One approach is microfluidic chips with external pumps for the fluid movement (Li et al., 2006; Kricka and Wilding, 2003; Chou et al., 2002). We describe a much simpler thermo-convective PCR where the fluid movement is induced by a temperature gradient. The general possibility was first described in a patent by Hwang et al., 2001. Later on, modified types of convective PCR were described in the literature (Krishnan et al., 2002; Agrawal et al., 2007; Hennig and Braun, 2005; Wheeler et al., 2004; Braun and Libchaber, 2004a; Chen et al., 2004; Braun, 2004b). Braun et al., 2003 used fluorescence measurements to determine the amount of amplified DNA. Theoretical considerations and numeri-

cal simulations showed the presence of dead zones, explaining the relatively long time needed for the amplification by the convective approach (Allen et al., 2009).

Electrochemical applications with directly heated microwires have attained considerable attention during the last decade. Heated wire electrodes were used for several analytical purposes. Gründler et al. introduced the “hot-wire-electrochemistry” ([www.hot-wire-electrochemistry.de](http://www.hot-wire-electrochemistry.de)) with a symmetric working-electrode contact as well as the temperature-pulse voltammetry (TPV). In these approaches, noble metal wire electrodes (mostly 25 μm in diameter) were used (Gründler et al., 1996). Determinations of arsenic(V) (Gründler and Flechsig, 1998) and mercury (Wang et al., 1999) at gold, as well as lead on platinum electrodes (Zerihun and Gründler, 1996), were reported. Hot wire detectors were also applied in flow systems (Wang et al., 2000). We suggested thermal control of DNA hybridization at heated gold wire electrodes which were modified with a thiol-linked DNA probe layer (Flechsig et al., 2005). Directly heated graphite electrodes have been applied for the determination of trace riboflavin (Sun et al., 2007; Wu et al., 2007). The temperature field around a heated microwire has been the subject of several theoretical and empirical studies (Gründler et al., 1996; Frischmuth et al., 1996; Schneider et al., 2000; Beckmann et al., 2000). Heated microwires are also useful for thermal control of catalytic nanomotor movement (Balasubramanian et al., 2009). A good overview

\* Corresponding author at: University of Rostock, Department of Chemistry, A.-Einstein-Str. 3a, D-18051 Rostock, Germany. Tel.: +49 381 4986470 fax: +49 381 4986461.

E-mail address: [gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de](mailto:gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de) (G.-U. Flechsig).

URL: <http://www.gensoric.com> (G.-U. Flechsig).

on high-temperature electrochemistry is given in recent reviews (Wildgoose et al., 2004; Gründler and Flechsig, 2006).

With heated microwires, the reaction temperature of DNA hybridization processes can be adjusted without heating the whole bulk solution. This is of advantage when thermo-sensitive compounds are employed. The convection induced by punctual heating of the bulk solution results in a mass transport of all reaction-components.

Osmium tetroxide bipyridine ([OsO<sub>4</sub>(bipy)]) is a versatile covalent label for nucleic acids containing pyrimidine bases (Palecek et al., 1981; Palecek and Hung, 1983; Lukasova et al., 1982; Lukasova et al., 1984). The C–C double bond in the pyrimidine ring is oxidized and the osmium complex added forms a glycol ester of osmic(VI)acid. This label yields high and reversible voltammetric signals (Palecek, 1992). It can also be applied for hybridization detection with peptide nucleic acids (Palecek et al., 2009). Adsorptive stripping voltammetric response of various osmium tetroxide-modified nucleic acids species at different electrode materials has been compared recently (Trefulka et al., 2007). Intact double stranded DNA does not react with [OsO<sub>4</sub>(bipy)]. On the other hand, a single strand, thoroughly modified with [OsO<sub>4</sub>(bipy)] at all pyrimidine bases, cannot hybridize with its complementary strand. These properties are exploited when protective strands are introduced to protect a certain recognition site within the target strand (Fojta et al., 2007; Flechsig and Reske, 2007). The common PCR protocols must be modified accordingly. Asymmetric PCR with one primer in large excess yields single-stranded as well as double stranded PCR products, which can be modified with [OsO<sub>4</sub>(bipy)] followed by hybridization with surface-confined capture probes and voltammetric detection (Mix et al., 2009). First results on electrochemical real-time-PCR have been reported (Yeung et al., 2006).

In this work, we demonstrate for the first time that an asymmetric convective PCR can be conducted in a modified PCR-tube with a built-in heated microwire. The resulting PCR-product could be detected electrochemically by a probe-modified gold disk electrode after labeling with the electrochemically active [OsO<sub>4</sub>(bipy)].

## 2. Experimental

2,2'-Bipyridine was delivered by Merck. Osmium tetroxide as a 2% aqueous solution was obtained from Fluka. All DNA oligonucleotides (probes, targets and protector strands) were delivered by Friz Biochem GmbH (Munich, Germany). The "Tris-buffer" (containing 10 mmol/l tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Fluka) and 0.5 mol/l sodium sulfate (Fluka)) was adjusted to pH 7.5 using sulfuric acid. Table 1 lists the sequences of all DNA-strands together with their length and designations used in this paper. The protector oligonucleotides were designed to have five mismatches (bold in Table 1) to facilitate their later displacement by the immobilized F-probe. Highly purified water (>18 MΩ cm, TOC < 2 ppb) prepared using a system of SG Water (Barsbüttel, Germany) was used in all experiments.

**Table 1**

DNA sequences, the mismatches in the protective strand are highlighted.

Designation	Length	Sequence
Fragment	136	5'-CTTACAGGAATTGTTTTGGGACTTGCAAGGGCTT-TTGAGAGGCATTAGCAGTTCAAATGGTAATAGGT-AATACAGTAAAATCAGCTCAAGGACTTTTTTCTCCT-ACTACCATTGACAAGCGTACTTACAATGG-3'
F-protector	27	5'-AAG <b>AG</b> CATGAGCTGATTTT <b>AGTGA</b> AATT-3'
F-probe	27	5'-AAGTCCITGAGCTGATTTTACTGTAIT-TTTTTTTTTTTTTT[Dithio]3-3'
MON810-probe	26	5'-AGATACCAAGCGCCATGGACAACAA- aaaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Forward primer C.aceto F	21	5'-CTTACAGGAATTGTTTTGGGA-3'
Reverse primer C.aceto R	21	5'-CCATTGTAAGTACGCTTGTCA-3'

### 2.1. Preparation of the PCR-E-Cup and temperature calibration

A 0.2 ml-PCR-tube was punctured twice close to its bottom. A 25 μm diameter platinum wire was inserted through the holes and the ends were contacted by soldering. To seal the holes completely, the wired tube was inserted into a 1.5 ml-E-Cup filled with epoxy after the top 1.5 cm of the E-Cup was cut off. The epoxy was left for hardening for at least 24 h. A potentiometric temperature calibration of each PCR-E-Cup was performed with an Autolab PSTAT10 (Ecochemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by a PC with GPES 4.8 software in a solution containing equimolar 5 mmol/l ferri-/ferrocyanide and 0.1 mol/l KCl vs. Ag/AgCl (3 mol/l KCl) at 50 °C bulk solution temperature. The parameters for zero current potentiometry were an interval time of 0.2 s and a maximum measurement time of 1999 s. The heating current was supplied by a heating device developed in our group before (Wachholz et al., 2007). The potential difference was divided by −1.56 mV/K (the temperature coefficient for the equimolar ferri-/ferrocyanide system) to obtain the temperature difference. The latter was then added to 50 °C (bulk temperature) to achieve the effective temperature of the platinum wire.

### 2.2. Thermo-convective PCR with the PCR-E-Cup

The asymmetric PCR was performed with 100 ng of template DNA, 0.4 μmol/l dNTPs, 1 μmol/l of the primer C.aceto F and 0.1 μmol/l C.aceto R (Table 1), and 2.5 U Sawady-Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in 50 μl reaction volume. The PCR-E-Cup was filled with the PCR-reaction solution which was covered with a 40 μl mineral oil seal to avoid evaporation. It was placed in a waterbath at  $T_{\text{ext}} = 50\text{ °C} = 323.15\text{ K}$ . An approximate wire temperature of  $T_{\text{heat}} = 89\text{ °C} = 362.15\text{ K}$  was adjusted according to the temperature calibration by applying the correct heating current with respect to the different experiment durations of 0, 5, 10, 15, 30 and 45 min. After this thermo-convective PCR period, the PCR-E-Cup was incubated for another 30 min in the water bath at  $T_{\text{ext}} = 50\text{ °C}$  to complete the last primer elongation.

### 2.3. Preparation of the probe SAM-modified gold electrodes

The gold disk electrode (Metrohm, Switzerland) was polished using corundum 0.3 μm (Buehler) and thoroughly rinsed with water. After this, the electrode was electrochemically treated with 25 voltammetric cycles between −0.2 and +1.65 V at 100 mV/s in 0.5 mol/l sulfuric acid and again rinsed with water. A droplet of 15 μl probe solution (30.3 μmol/l) was placed onto the electrode surface in order to form the capture probe SAM. After 16 h at 10 °C in a water-saturated atmosphere, the electrode was rinsed and immersed in 1 mmol/l aqueous mercaptohexanol solution for 1 h.



#### 2.4. Hybridization and dehybridization procedure

The probe-SAM-modified gold disk electrode was dipped for 30 min hybridization into a beaker containing the target solution (Os-modified PCR products, see below). The sample solution was stirred constantly using a magnetic stirrer and heated in a water bath. After hybridization the electrode was rinsed with Tris-buffer. The electrode was regenerated by a dehybridization step following the electrochemical measurement. To retrieve the probe-SAM back, the electrode was immersed in 50 °C deionized water for 60 s.

#### 2.5. Electrochemical measurements

An Autolab PSTAT10 (Ecochemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by a PC with GPES 4.9 software and an electrode-stand inside a Faraday cage was used for all electrochemical procedures. Besides the probe-SAM-modified gold electrode, a Ag/AgCl (3 mol/l KCl) and a glassy carbon electrode were used as reference and counter electrodes, respectively (all from Metrohm AG, Herisau, Switzerland). The square-wave voltammetry was conducted at 200 Hz and an amplitude of 40 mV within a scan-range from -0.55 to 0.0 V. All measurements were performed at room temperature in Tris-buffer. The peak-shaped measuring signals were smoothed with a level 2 Savitzky-Golay filter and baseline-corrected (moving average, peak width 0.03) using the GPES 4.9 software.

#### 2.6. Conditions of control experiments for PCR and agarose gelelectrophoresis

A synthetic 136-base-DNA strand (sequence from the genome of *Clostridium acetobutylicum* [1855609–1855744]) was used as template. The asymmetric PCR was performed with 100 ng of template DNA, 0.4 μmol/l dNTPs, 1 μmol/l of the primer C.aceto F and 0.1 μmol/l C.aceto R (Table 1), and 2.5 U Sawady-Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in a reaction volume of 50 μl according to the manufacturer's instructions. For the symmetric PCR, an equal primer concentration of 0.5 μmol/l was used. For the PCRs, a thermocycler (Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler, Thermo Scientific) was used with the following parameters: 1 × 94 °C, 2 min; 30 × (94 °C, 30 s, 57 °C, 45 s, 72 °C, 30 s); 1 × 72 °C, 7 min. The agarose gelelectrophoresis was performed with a 2% (w/v) agarose gel in 1 × TAE-buffer (40 mmol/l tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, 20 mmol/l glacial acetic acid, 1 mmol/l EDTA) for 45 min at 80 V. The gels were stained with Gelred (Cambridge Bio-Science, UK) for 30 min and visualized on a Transilluminator UST-20M-8PC (Biostep, Jahnsdorf, Germany) under a darkhood DH-40/50 (Biostep, Jahnsdorf, Germany) and photographed with an Olympus C-7070 digital camera with an ethidiumbromide-filter (540–640 nm). All DNA-concentrations were evaluated visually in the agarose gel using the DNA-ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Germany) as a comparison.

#### 2.7. Modification of amplified fragment oligonucleotide (Target)

For modification with [OsO<sub>4</sub>(bipy)], 100 μl of asymmetric PCR-solution from the PCR-E-Cup (containing the amplified single target strand Fragment) were used without further purification. The Fragment aliquots were mixed at their maximum concentrations (~10 nmol/l) with 1 μl of the protective strand F-Protector (10 μmol/l in the hybridization solution) and left for 2 h at room temperature to allow hybridization. A solution containing 10 mmol/l osmium tetroxide and 10 mmol/l 2,2'-bipyridine (forming [OsO<sub>4</sub>(bipy)]) was then added to achieve a final concentration of 2 mmol/l of [OsO<sub>4</sub>(bipy)] and left at room temperature for 2 h. After this period, the excess of the osmium complex was removed by

dialysis against pure Tris-buffer at 4 °C for 19 h using Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 3500 MWCO (Rockford, IL, USA). After dialysis, the purified solution (containing the osmium-labeled target Fragment) was used for the hybridization experiments.

#### 2.8. FEM-simulation

In our experiments, a heated microwire drove the thermo-convective flow of the PCR-solution. The temperature distribution and the resulting fluid flow inside the small PCR-tube were considered by FEM-simulation employing the General Heat Transfer and the Weakly Compressible Navier-Stokes modules of the FEM-software Comsol Multiphysics 3.5.

The following material parameters were used. For polypropylene (PCR-tubes) and the epoxy resin  $k=0.22 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $C_p=1680 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\rho=906 \text{ kg m}^{-3}$  and  $k=0.252(0.118+0.88(T-T_0)) \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $C_p=1520 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\rho=1150 \text{ kg m}^{-3}$ , respectively. For air:  $k=0.261 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $C_p=717 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\rho=1293 \text{ kg m}^{-3}$ , mineral oil:  $k=0.15 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $C_p=2130 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\rho=800 \text{ kg m}^{-3}$ , the aqueous PCR solution:  $k=-0.719416+(7.2455 \times 10^{-3}T)-(9.37413 \times 10^{-6}T^2) \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $C_p=207872.047528-(3031.74)+(18.0348T^2)-(535876 \times 10^{-2}T^3)+(7.95093 \times 10^{-5}T^4)-(4.71045 \times 10^{-8}T^5) \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\rho=233.172+(6.76474T)-(0.0187743T^2)+(1.56896 \times 10^{-5}T^3) \text{ kg m}^{-3}$ ,  $\alpha=9.14 \cdot 10^{-4}+5.7 \cdot 10^{-2}e^{(-1.4 \cdot 10^{-2}T)}$ , and platinum-heating wire:  $k=71.6 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $C_p=133 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\rho=21450 \text{ kg m}^{-3}$ . The parameters for every material were included as temperature dependent values if possible, otherwise fixed values were used (Lide, 1998; Assael et al., 2008).

A mesh of 162002 degrees of freedom was generated for the 3-dimensional geometry. The equation used in the heat transfer module for the solid bodies was  $\nabla \cdot (-k \nabla T) = Q$ . For the fluids the convective heat transfer was applied resulting in  $\nabla \cdot (-k \nabla T) = Q - \rho C_p u \cdot \nabla T + n[\nabla u + (\nabla u)^T - 2/3(\nabla \cdot u)] : \nabla u$  with  $n[\nabla u + (\nabla u)^T - 2/3(\nabla \cdot u)] : \nabla u \equiv \sum_{i,j} n[\nabla u + (\nabla u)^T - 2/3(\nabla \cdot u)]_{i,j} \nabla u_{i,j}$ , the contraction

of the two tensors. Lateral external boundaries of the big PCR-tube were set to the water bath temperature  $T_{\text{ext}}=323.15 \text{ K}$ . The top boundaries were assumed to be thermally insulated because of their contact to air. The boundaries of the heating wire were assumed to be  $T_{\text{heat}}=362.15 \text{ K}$ . All other boundaries were set to continuity. In the Weakly Compressible Navier-Stokes module the equations  $\rho(u \cdot \nabla)u = \nabla[-\rho I + n(\nabla u + (\nabla u)^T) - (2\eta/3 - \kappa_{\text{div}})(\nabla \cdot u)] + F$  with  $F$  being the convective force, and  $\nabla \cdot (\rho u) = 0$  were used to solve the fluid-flow problem inside the small PCR-tube (for variables please see Table 2). This module was only applied inside the PCR solution in the small PCR-tube in order to minimize the solving time. The boundary conditions were set to no-slip conditions at the tube boundaries and to slip condition at the solution-to-oil boundary.

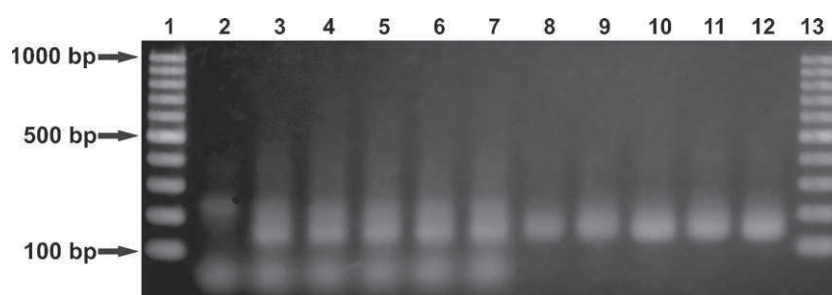
### 3. Results and discussion

We compared the thermo-convective PCR results with those of the classical thermocycler PCR to verify the thermo-convective PCR in our Pt-wire PCR-E-Cup. Fig. 1 compares the gelelectrophoretic analysis of the thermo-convective symmetric PCR (lanes 2–7) after 0, 5, 10, 15, 30 and 45 min with the classical symmetric PCR performed in a thermocycler (lanes 8–12). For calculation of the efficiency of the heated wire PCR-E-Cups, the PCR-samples from the thermocycler were removed after 10 (lane 8), 15 (lane 9), 20 (lane 10), 25 (lane 11), and 30 cycles (lane 12). The comparison of the band intensities reveals a lower efficiency of the thermo-convective PCR.

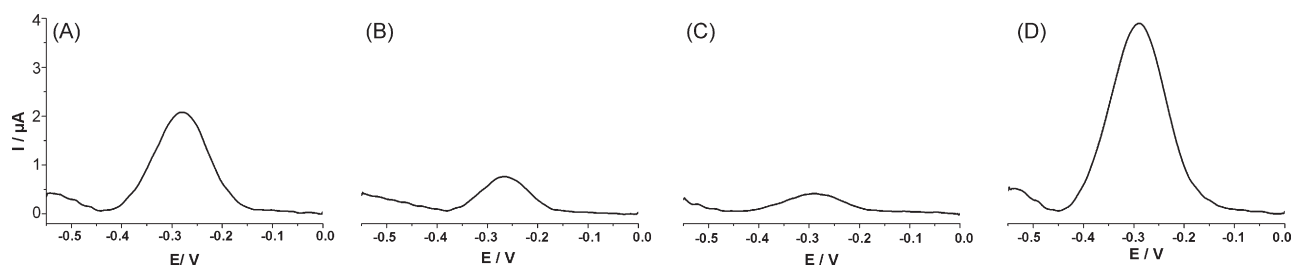
**Table 2**

Summary of variables and input values for the 3-dimensional FEM-model.

Symbol	Variable	Remarks
$g$	Gravity acceleration	$g = 9.81 \text{ ms}^{-1}$
$k$	Thermal conductivity	T-dependent (see: Lide, 1998 and manufacturer data sheets)
$n$	Normal unit vector	–
$C_p$	Heat capacity	T-dependent (see: Lide, 1998 and manufacturer data sheets)
$F$	Convective force	$F = \alpha \rho g (T - T_{\text{ext}})$
$I$	Identity matrix or unit diagonal matrix	–
$Q$	Heat source	$Q = 0$
$T$	Temperature	Solved by general heat transfer module
$T_{\text{ext}}, T_{\text{heat}}$	External and heating wire temperature	$T_{\text{ext}} = 323.15 \text{ K}, T_{\text{heat}} = 362.15 \text{ K}$
$\alpha$	Thermal coefficient of expansion	see: Lide, 1998 and manufacturer data sheets
$\kappa_{dv}$	Dilatational viscosity	$\kappa_{dv} = 0$
$\rho$	Density	T-dependent (see: Lide, 1998 and manufacturer data sheets)



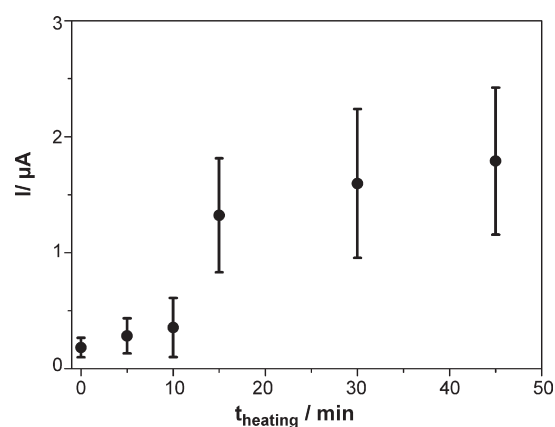
**Fig. 1.** 2% [w/v] agarose-gel stained with Gelred; lanes 1 + 13: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (0.1  $\mu\text{g}$ ); lanes 2–7: PCR with wire-heated PCR-tube, heating times: 0 min (lane 2), 5 min (lane 3), 10 min (lane 4), 15 min (lane 5), 30 min (lane 6), and 45 min (lane 7). Lanes 8–12: cyclor-PCR after different number of cycles: 10 (lane 8), 15 (lane 9), 20 (lane 10), 25 (lane 11), and 30 (lane 12).



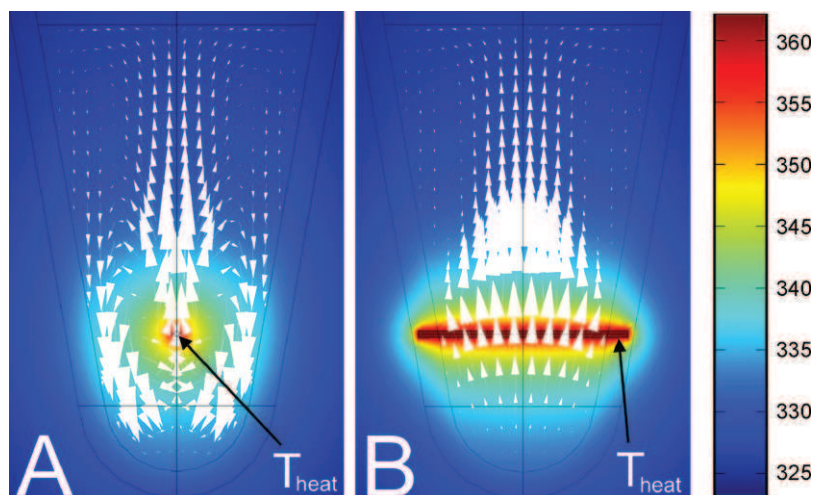
**Fig. 2.** Square-wave voltammetric signals at gold disk electrodes in Tris-buffer with immobilized probe strands; (A) F-probe with fragment (30 min heating), (B) non-complementary probe MON810 with fragment (30 min heating), (C) blank value F-probe with PCR-solution (not heated), (D) F-probe with fragment (produced in thermocycler); SWV conditions: frequency 200 Hz; amplitude 40 mV; During the hybridization step the solution was stirred by a magnetic stirrer at 20 °C.

Because of this lower efficiency, we expected very low electrochemical detection signals of the asymmetric convective PCR products. We pooled three different PCR samples from each convective PCR experiment (each experiment conducted for a different period of time) for the modification with  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  as described in Section 2.2. Results are displayed for the hybridization of the complementary F-probe and the non-complementary MON810-probe with the Fragment target sequence (Fig. 2). Sequence specific target detection was achieved as demonstrated in (A) and (B). The complementary capture probe generated a signal of approximately 2  $\mu\text{A}$  (Fig. 2A) whereas with the non-complementary capture probe only a signal of about 0.6  $\mu\text{A}$  (Fig. 2B) was obtained. The blank value represents the signal obtained with the probe-modified Au-electrode without heating the PCR solution in the wire-modified tube (Fig. 2C). As expected, the asymmetric PCR product obtained with the conventional thermocycler provided the largest signals (about 3.5  $\mu\text{A}$ , Fig. 2D). This indicates that the efficiency of the asymmetric PCR is only slightly reduced in the thermo-convective mode. All peaks are caused by the reversible redox couple osmium(IV/VI) in the covalent glycol osmate labels.

Fig. 3 depicts the dependency between the heating time of the thermo-convective asymmetric PCR and the obtained electrochem-



**Fig. 3.** Square-wave voltammetric signals at gold disk electrodes in Tris-buffer after 15 min of hybridization.  $t_{\text{heating}}$  represents the onset of solution heating by the platinum wire; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV. During the hybridization step the solution was stirred by a magnetic stirrer. The Error bars represent standard deviations of results obtained during three independent thermo-convective PCR runs.



**Fig. 4.** Temperature distribution and velocity field inside the PCR-E-Cup with views along (A) and perpendicular (B) to the heating wire.  $T_{\text{heat}}$  is the hottest area and marks the position of the heating wire. The directions and the lengths of the arrows represent the direction and velocity of the convection in the PCR-solution (longer arrows correspond to higher velocity).

ical signal. The error bars represent the deviation observed in three different PCR batches with three different probe-modified Au-electrodes. With increasing heating times, growing electrochemical signals were obtained. The strong increase between 10 and 15 min was reproducible. These findings are in very good accordance with results reported by Braun et al., 2003 who used fluorescence detection. We suppose that in this period of time the reaction is in its exponential amplification period leveling off after about 15 min. Accordingly, a sigmoidal behavior, typical for real-time PCR is observed. This finding will be a focus of future work.

Consideration of the experimental PCR and the FEM-simulation results suggests a possible reason for the lower signal from the heated-wire tubes. Obviously, the circulating PCR-solution does not experience the optimal temperature sequence applied in the classical PCR (Fig. 4). The hottest area in the centre is surrounded by medium with a temperature decreasing to  $T_{\text{ext}}$  at the external boundaries. These results correspond to our gelelectrophoresis results (Fig. 1) as well as to the lower product yield in the electrochemical measurements observed with the PCR-E-Cup compared to the classical PCR (Fig. 2). The resulting electrochemical signals were approximately two times lower (Fig. 2A and D). Most probably, this is the result of the suboptimal mass transport in the PCR-E-Cup as shown in Fig. 4.

The PCR solution cycles through different temperature ranges driven by the thermal convection of the medium. Two large vortices with their central axes oriented parallel to the heating wire are observed. They generate wake space in their centers close to the heating wire. Spaces with a very low convection are also observed at the upper surface of the PCR-solution as well as at the bottom of the tube (Fig. 4). Obviously, the temperature sequence for denaturation, primer binding and elongation is suboptimal in comparison to a cycle in the classical PCR.

#### 4. Conclusions

We demonstrated that the asymmetric convective PCR in our simple PCR-E-Cup yielded products well detectable by square-wave voltammetry after only 5 to 10 min. The square-wave voltammetry was performed after modification of the PCR product with  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  and hybridization with capture probes on gold electrodes. Although the total product yield was significantly lower compared to the classical thermocycler PCR, the electrochemical signals still showed a very good signal-to-noise ratio.

We suppose the reasons for the lower PCR-product yield of the thermo-convective PCR are the suboptimal thermal sequence in the convective mass-flow and wake spaces that are largely excluded from the convections.

These properties can be nicely investigated by numerical models. Likewise, numerical calculations can be used to optimize thermo-convective PCR-systems, e.g. by variations of the length, orientation, or localization of the heated wire.

Thermo-convective PCR coupled with electrochemical detection holds great promise for future miniaturized bioanalytical sensor devices.

#### Acknowledgement

The authors are grateful to the Federal State of Mecklenburg-Vorpommern (Landesexzellenzförderung), and ESF/IV-WM-B34-0018/08, as well as to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Heisenberg Fellowship FL 384/7-1, Grants FL 384/4-2 and FL 384/8-1) for financial support.

#### References

- Agrawal, N., Hassan, Y.A., Ugaz, V.M., 2007. *Angewandte Chemie International Edition* 46 (23), 4316–4319.
- Allen, J.W., Kenward, M., Dorfman, K.D., 2009. *Microfluidics and Nanofluidics* 6 (1), 121–130.
- Assael, M.J., Antoniadis, K.D., Metaxa, I.N.J., 2008. *Journal of Chemical and Engineering Data*, doi:10.1021/jc8006452.
- Balasubramanian, S., Kagan, D., Manesh, K.M., Calvo-Marzal, P., Flechsig, G.-U., Wang, J., 2009. *Small* 5 (13), 1569–1574.
- Beckmann, A., Coles, B.A., Compton, R.G., Gründler, P., Marken, F., Neudeck, A., 2000. *Journal of Physical Chemistry B* 104 (4), 764–769.
- Braun, D., Goddard, N.L., Libchaber, A., 2003. *Physical Review Letters* 91 (15), 158103-1-158103-4.
- Braun, D., Libchaber, A., 2004a. *Physical Biology* 1 (1–2), P1–P8.
- Braun, D., 2004b. *Modern Physics Letters B* 18 (16), 775–784.
- Chen, Z., Qian, S., Abrams, W.R., Malamud, D., Bau, H.H., 2004. *Analytical Chemistry* 76 (13), 3707–3715.
- Chou, C.F., Changrani, R., Roberts, P., Sadler, D., Burdon, J., Zenhausern, F., Lin, S., Mulholland, A., Swami, N., Terbrueggen, R., 2002. *Microelectronic Engineering* 61 (2), 921–925.
- Flechsig, G.-U., Peter, J., Hartwich, G., Wang, J., Gründler, P., 2005. *Langmuir* 21 (17), 7848–7853.
- Flechsig, G.-U., Reske, T., 2007. *Analytical Chemistry* 79 (5), 2125–2130.
- Fojta, M., Kostecka, P., Trefulka, M.R., Havran, L., Palecek, E., 2007. *Analytical Chemistry* 79 (3), 1022–1029.
- Frischmuth, K., Visocky, P., Gründler, P., 1996. *International Journal of Engineering Science* 34 (5), 523–530.
- Gründler, P., Kirbs, A., Zerihun, T., 1996. *Analyst* 121 (12), 1805–1810.
- Gründler, P., Flechsig, G.-U., 1998. *Electrochimica Acta* 43 (23), 3451–3458.

- Gründler, P., Flechsig, G.-U., 2006. *Microchimica Acta* 154 (3–4), 175–189.
- Hennig, M., Braun, D., 2005. *Applied Physics Letters* 87 (18), 183901.
- Hwang, H.J., Kim, J.H., Jeong, K., 2001. Patent KR 2001057040, WO 2003/038127.
- Kricka, L.J., Wilding, P., 2003. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (5), 820–825.
- Krishnan, M., Ugaz, V.M., Burns, M.A., 2002. *Science* 298 (5594), 793.
- Li, S., Fozdar, D.Y., Ali, M.F., Li, H., Shao, D., Vykoukal, D.M., Vykoukal, J., Floriano, P.N., Olsen, M., Mc Devitt, J.T., Gascoyne, P.R.C., Chen, S., 2006. *Journal of Microelectromechanical Systems* 15 (1), 223–236.
- Lide, D.R., 1998. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton.
- Lukasova, E., Jelen, F., Palecek, E., 1982. *General Physiology Biophysics* 1 (1), 53–70.
- Lukasova, E., Vojtiskova, M., Jelen, F., Sticzay, T., Palecek, E., 1984. *General Physiology Biophysics* 3 (2), 175–191.
- Mix, M., Reske, T., Duwensee, H., Flechsig, G.-U., 2009. *Electroanalysis* 21 (7), 826–830.
- Palecek, E., Lukasova, E., Jelen, F., Vojtiskova, M., 1981. *Bioelectrochemistry Bioenergetics* 8 (5), 497–506.
- Palecek, E., Hung, M.A., 1983. *Analytical Biochemistry* 132 (2), 236–242.
- Palecek, E., 1992. *Methods Enzymology* 212, 139–155.
- Palecek, E., Trefulka, M., Fojta, M., 2009. *Electrochemistry Communications* 11 (2), 359–362.
- Schneider, A., Flechsig, G.-U., Gründler, P., 2000. *Journal of the Electrochemical Society* 147 (10), 3768–3770.
- Sun, J.J., Guo, L., Zhang, D.F., Yin, W.H., Chen, G.N., 2007. *Electrochemistry Communications* 9 (2), 283–288.
- Trefulka, M., Ferreyra, N., Ostatna, V., Fojta, M., Rivas, G., Palecek, E., 2007. *Electroanalysis* 19 (12), 1334–1338.
- Wachholz, F., Gimsa, J., Duwensee, H., Grabow, H., Gründler, P., Flechsig, G.-U., 2007. *Electroanalysis* 19 (5), 535–540.
- Wang, J., Gründler, P., Flechsig, G.-U., Jasinski, M., Lu, J., Wang, J., Zhao, Z., Tian, B., 1999. *Analytical Chimica Acta* 396 (1), 33–37.
- Wang, J., Jasinski, M., Flechsig, G.-U., Gründler, P., Tian, B., 2000. *Talanta* 50 (6), 1205–1210.
- Wheeler, E.K., Benett, W., Stratton, P., Richards, J., Chen, A., Christian, A., Ness, K.D., Ortega, J., Li, L.G., Weisgraber, T.H., Goodson, K., Milanovich, F., 2004. *Analytical Chemistry* 76 (14), 4011–4016.
- Wildgoose, G.G., Giovanelli, D., Lawrence, N.S., Compton, R.G., 2004. *Electroanalysis* 16 (6), 421–433.
- Wu, S.H., Sun, J.J., Lin, Z.B., Wu, A.H., Zeng, Y.M., Guo, L., Zhang, D.F., Dai, H.M., Chen, G.N., 2007. *Electroanalysis* 19 (21), 2251–2257.
- Yeung, S.S.W., Lee, T.M.H., Hsing, I.-M., 2006. *Journal of the American Chemical Society* 128 (41), 13374–13375.
- Zerihun, T., Gründler, P., 1996. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 415 (1–2), 85–88.

## **Publikation 5**

Duwensee H, Mix M, Broer I, Flechsig G-U: Electrochemical detection of modified maize gene sequences by multiplexed labeling with osmium tetroxide bipyridine. *Electrochem. Comm.* 11 (7); 2009; 1487-1491

(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2009.05.037>)



Contents lists available at ScienceDirect

# Electrochemistry Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/elecom](http://www.elsevier.com/locate/elecom)

## Electrochemical detection of modified maize gene sequences by multiplexed labeling with osmium tetroxide bipyridine

Heiko Duwensee<sup>a</sup>, Maren Mix<sup>a</sup>, Inge Broer<sup>b</sup>, Gerd-Uwe Flechsig<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Chemistry, University of Rostock, Dr.-Lorenz-Weg 1, 18059 Rostock, Germany<sup>b</sup> Department of Land Use, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 8, 18059 Rostock, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 March 2009

Received in revised form 15 May 2009

Accepted 19 May 2009

Available online 28 May 2009

#### Keywords:

Assorted labeled targets

Square-wave voltammetry, SWV

Osmium tetroxide bipyridine

Covalent DNA-label

Electrochemical hybridization detection

Genetically modified maize

### ABSTRACT

In this report we demonstrate an approach for the electrochemical detection of four sequences from maize and genetically modified (GM) maize by means of square-wave voltammetry (SWV). After multiplexed labeling with osmium tetroxide bipyridine ([OsO<sub>4</sub>(bipy)]), the target oligonucleotides are hybridized with a complementary DNA capture probe immobilized on gold electrodes. The multiplexed labeling was performed by mixing the four target strands with the respective oligonucleotides 80% homologous to the central target recognition sequences in order to protect the latter from binding of [OsO<sub>4</sub>(bipy)] to its thymine or cytosine residues. All components were added to the same solution. No significant decreases in SWV hybridization signals were observed after such multiplexed labeling of up to four target strands in the same reaction batch. Obtained voltammetric signals were significantly higher at 50 °C compared to 25 °C hybridization temperature and very low response was observed for non-complementary strands. Multiplexed labeling with osmium tetroxide bipyridine holds great promise for the development of simple and effective voltammetric detection protocols for GM organisms.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Over the past decade, electrochemical detection of nucleic acid hybridization has become a common tool besides classical molecular biological methods such as Southern or Northern blots. The electrochemical transduction can be performed using covalent labels, intercalators or ions interacting electrostatically with the DNA. Exploiting the electrochemical activity of the DNA is also possible.

Electrochemical detection of DNA sequences can be performed such as by using self-assembled monolayers of capture probes on electrode surfaces [1–6] or hybridization at magnetic beads coupled with AdSV (“two surface strategy”) [7,8]. Our group reported about [OsO<sub>4</sub>(bipy)] as an electrochemically reversible covalent DNA-label together with thiol-linked probe oligonucleotides on gold electrodes [9].

Other approaches for the electrochemical hybridization detection of PCR products or oligonucleotides include methylene blue [10,11] or sandwich hybridization with an alkaline phosphatase conjugate on biotinylated signaling probes [12]. The different methods of electrochemical hybridization detection have been reviewed several times [13–18]. The complex [OsO<sub>4</sub>(bipy)] can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label as

described by Palecek et al. [19–22]. It reacts with the pyrimidine bases [23] under oxidation of the C–C-double bond in the pyrimidine ring forming a diester of osmic(VI) acid. This modification can be easily accomplished with single-stranded oligonucleotides or PCR products by formation of a central double strand with a protective partly homologous oligonucleotide as we have described earlier [9,25,26]. Besides single-stranded DNA, also tRNA can be labeled with osmium tetroxide [27]. Also PNA can be modified with this osmium complex, allowing stripping detection at the low pM level [24]. The temperature influence upon the hybridization process using protective strands has been characterized earlier [28]. “Multicolor labeling” of different target strands is possible using osmium tetroxide complexes with different tertiary amine ligands, which influence the electrochemical potential of the resulting covalent osmium(VI)-labels [29].

Here, we describe a simple approach for multiplexed covalent labeling of target oligonucleotides representing four sequences designed to discriminate between natural and genetically modified maize.

### 2. Experimental

#### 2.1. Material

2,2'-Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide was obtained as a 2% aqueous solution from Fluka. All DNA

\* Corresponding author. Tel.: +49 381 4986470; fax: +49 381 4986461.

E-mail address: [gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de](mailto:gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de) (G.-U. Flechsig).

oligonucleotides (*probes, targets and protector strands*) were delivered by Friz Biochem (Neuried, Germany). The “tris-buffer” contained 10 mmol/l tris-(hydroxymethyl)-aminomethane and 0.5 mol/l sodium sulfate and was adjusted to pH 7.5 using sulfuric acid. The sequences of all DNA-strands together with their length and designations are given in Table 1. All *protector* oligonucleotides contain 3 to 5 mismatches (underlined in Table 1) to ease their later displacement by the immobilized probes.

## 2.2. Modification of target oligonucleotides

The *target oligonucleotides* and the 80% homologous protective strands were mixed in equimolar ratio and left for two hours at room temperature to allow hybridization. The probe SSIIb detects the starch synthase gene IIb and the probe ivrp detects the invertase gene of maize therefore serving as a positive control for the detection of maize. The probe CRY detects the existence of the cryIa/b transgene within the sample and the probe 810 detects the existence of the transgene at the MON 810 specific insertion locus in the maize genome. By choosing these sequences one can (a) detect the presence of maize (SSIIb and ivrp), (b) detect the presence of a specific transgene cryIa/b (CRY) and (c) detect the presence of the specific event Mon 810 (810) [30]. The sequences are given in Table 1.

The dialysis procedure, the preparation of SAM-modified gold electrodes, the hybridization and dehybridization procedures, and the electrochemical measurements have been described in more detail earlier [9].

## 3. Results and discussion

Fig. 1A and B display the effect of the hybridization temperature upon SWV signals of the capture probe ivrp hybridized with either the complementary ivrp target or the non-complementary 810 target. In this figure as in all other figures where hybridization signals are displayed as voltammetric responses, representative peaks were chosen that were closest to the average value of three individual experiments. While the response of both strands is visible after room temperature hybridization (Fig. 1A), the signal of ivrp is about 10-times higher than the non-complementary strand. At optimized 50 °C hybridization temperature, the non-specific response is completely suppressed (Fig. 1B). Similar optimized conditions were used in previous work [26]. This demonstrates not only the selectivity of the probes to their respective targets (as it is displayed further in Fig. 2), but also the influence of optimized temperature. The latter does not only increase the selectivity, but also the sensitivity of the sensor. We found the signal height to be approximately four times higher at 50 °C compared to room temperature. Further temperature optimization is displayed also in Fig. 1 (C and D). It depicts calibration plots for the targets 810

and ivrp at 40 °C (C) and 50 °C (D) hybridization temperature in three separate calibration experiments each with separately prepared target, probe and electrode. 10 nM target could be detected in both cases. The signal increase when going from 40 °C to 50 °C was 2-fold and 4-fold in case of 810 and ivrp, respectively. The lower signal of ivrp at 40 °C is probably due to stable secondary structures of the probe ivrp at lower temperatures. Other reasons for increased signals at elevated hybridization temperature include enhanced mass transport due to diffusion and thermal microstirring [31]. At 40 °C, linear calibration ranges could be found up to 50 and 100 nM for 810 and ivrp, respectively (Fig. 1C). At 50 °C, however, an almost linear calibration range could be observed between 25 and 200 nM for both targets (Fig. 1D). Although coefficient of determination  $r^2$  was better for a squared calibration function compared to a linear one, the difference between the residual sums of squares was not significant ( $F$ -test, not shown). These findings indicate how important an individually optimized hybridization temperature is. Reproducibility (as indicated by error bars) was found to be good even if comparing responses of independent repetitive measurement series each obtained with a newly prepared probe SAM. Similar high standard deviations have been observed before [26].

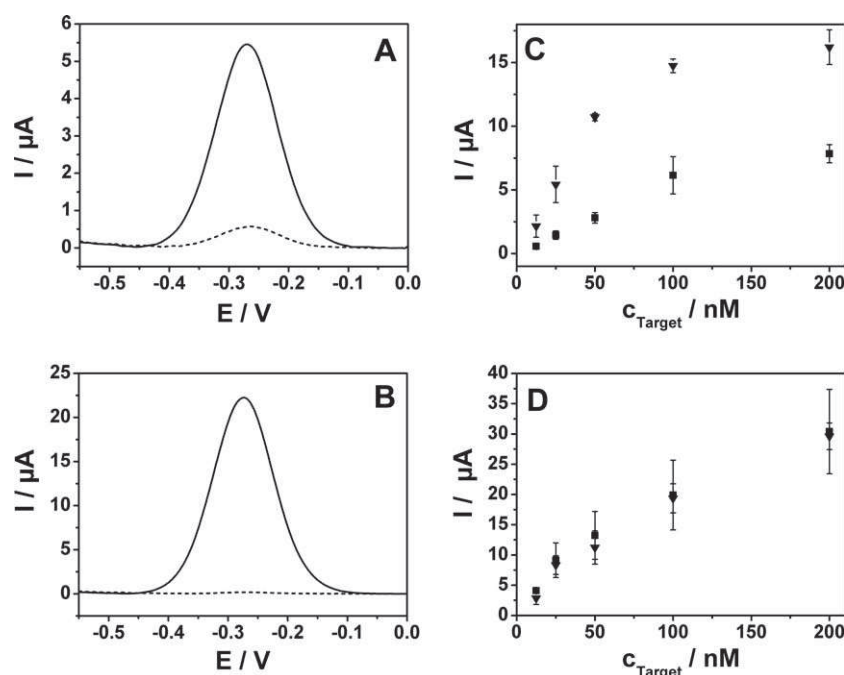
Fig. 2 exhibits how the four different capture probes ivrp, SSIIb, 810 and CRY (Table 1) respond to the four different targets in separate experiments. In Fig. 2A, the capture probe ivrp yields only response after hybridization with the full matching target ivrp. All other sequences are non-specific and fully suppressed. In comparison, the three other capture probes show full selectivity only with certain non-specific strands; however, in all cases, the non-specific response is greatly reduced due to the optimized 50 °C hybridization temperature. In these cases, all targets had been protected with their special protective strands during the modification with osmium tetroxide bipyridine.

In Fig. 3, it is demonstrated how a sample containing different target strands can be investigated using different capture probe-modified electrodes. Error bars indicate standard deviations of three independent repetitive experiments with different targets, probes and newly prepared probe SAMs. Probe ivrp only yields large response when the mixed sample contains the ivrp target sequence (Fig. 3A). Mixed samples containing mixed non-specific 810, SSIIb and CRY sequences yield much smaller signals (10 to 30 times smaller). Similar applies to probe 810 as displayed in Fig. 3B. Only target 810 gave a large response while signals of the three mixed non-specific sequences have been greatly suppressed.

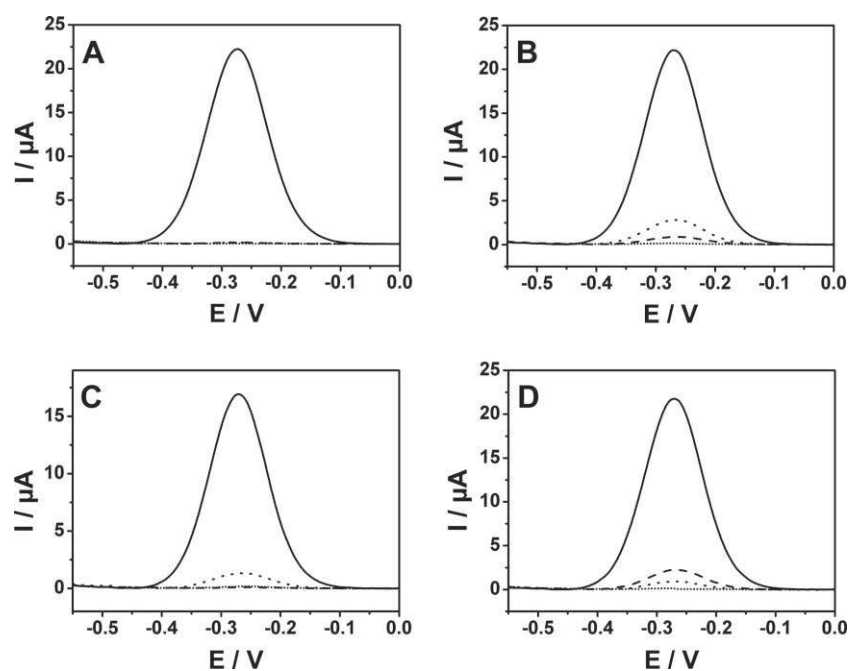
Furthermore, we demonstrate in Fig. 3C how genetically modified maize sequences can be discriminated from the wild type sequence by means of four working electrodes, each modified with another kind of capture probes. Probe 810 and probe CRY, which are designed for indicating the genetic modification, yielded only

**Table 1**  
Sequences of deoxyoligonucleotides.

Designation	Length	Sequence
Probe ivrp	29 + 15 a	5'-CACGTGAGAATTTCCGTCTACTCGAGCCT- aaaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Target ivrp	29 + 5 t	5'-ttttAGGCTCGAGTAGACGGAAATTCACCGT-3'
Protector ivrp	29	5'-CACGTGAGAATTTCCGTCTA <u>GTGC</u> AGCCT-3'
Probe SSIIb	25 + 15 a	5'-AGCAAAGTCAGAGCGCTCAATGCA-aaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Target SSIIb	25 + 5 t	5'-ttttTGCATTGCGCGCTCTGACTTTGCT-3'
Protector SSIIb	25	5'-A <u>CG</u> AAAGTCAGAGCGCT <u>CGA</u> ATGGA-3'
Probe CRY	26 + 15 a	5'-AGATACCAAGCGCCATGACAAACA-aaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Target CRY	26 + 5 t	5'-ttttTTGTTGCCATGGCCGCTTGGTATCT-3'
Protector CRY	26	5'-AGATA <u>G</u> CAAGCGCCATG <u>CAG</u> AAGAA-3'
Probe 810	23 + 15 a	5'-AACATCCTTTGCCATTGCCAGC- aaaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Target 810	23 + 5 t	5'-ttttGCTGGGCAATGCAAAGGATGTT-3'
Protector 810	23	5'-AACATCCTTTG <u>G</u> CATT <u>CCCC</u> ACG-3'



**Fig. 1.** Influence of temperature and target concentration during the hybridization step: Hybridization signal of probe ivrp after 15 min in 200 nM complementary target ivrp (solid line) and 200 nM non-complementary target 810 (dash line) at (A) 25 and (B) 50 °C; target ivrp with probe ivrp (triangles) and target 810 with probe 810 (squares) at (C) 40 and (D) 50 °C; covalent labeling of targets with  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ , SWV in tris-buffer at 200 Hz and 40 mV amplitude. The error bars indicate standard deviations of three independent repetitive measurement series, each obtained with a newly prepared probe SAM.

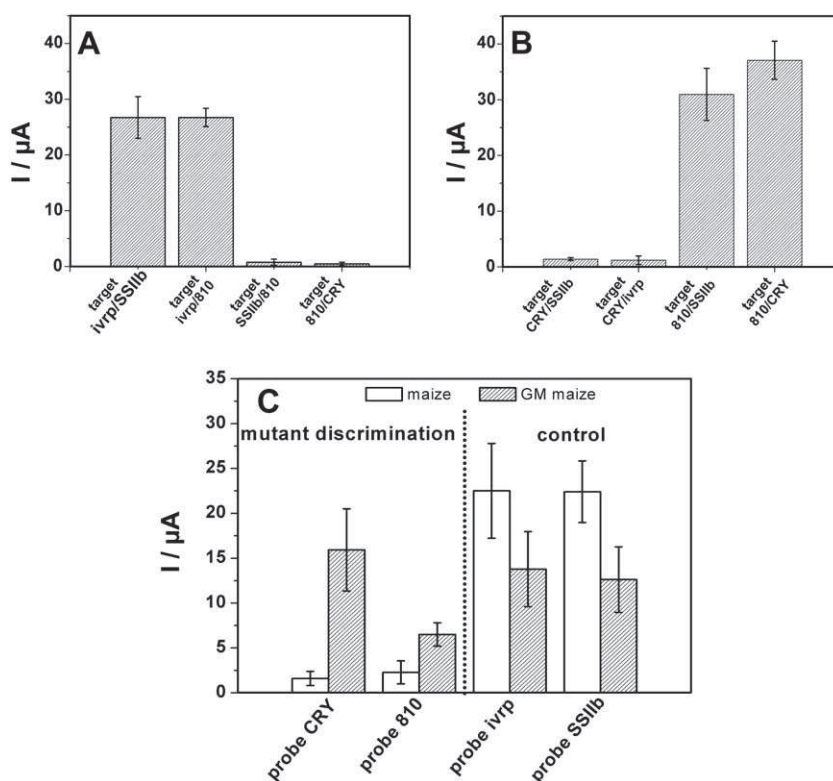


**Fig. 2.** Sequence selectivity of the immobilized probes: Signals of the different targets ivrp, 810, CRY and SSIIB after separate  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -modification and hybridization with the immobilized probes (A) ivrp, (B) SSIIB, (C) 810 and (D) CRY. Solid lines indicate the complementary target according to the probe, dashed line, short dashed line and dotted line indicate the different non-complementary targets; Hybridization was performed at 50 °C in a 200 nM target solution in tris-buffer for 15 min. Other conditions as in Fig. 1.

minor response in presence of the wild type sequences ivrp and SSIIB (white bars). Samples containing all four GM maize sequences yielded significantly higher response with the probes 810 and CRY allowing for discrimination from the wild type. The

presence of any maize in the sample was confirmed by the large response of the control probes ivrp and SSIIB. In contrast, all probes exhibited large signals when all targets were present in the sample as it would be true for GM maize (gray bars). The hybridization





**Fig. 3.** Multiplexed labeling of mixed targets in one beaker and detection of sequences from genetically modified maize or wild type samples: Hybridization of surface-confined probes with mixed target solutions: (A) probe ivrp with targets ivrp/810 or targets ivrp/SSIIb as well as mixed samples containing targets SSIIb/810 and 810/CRY (B) probe 810 with the targets 810/CRY, 810/SSIIb and the targets CRY/ivrp and CRY/SSIIb; (C) hybridization of probes ivrp, 810, CRY and SSIIb with mixed double targets containing only ivrp/SSIIb to detect maize (white bars) and with mixed targets containing ivrp/810/CRY/SSIIb to detect GM; each target concentration 200 nM in tris-buffer, 15 min hybridization at 50 °C, the error bars indicate standard deviations of independent repetitive measurement series, each obtained with a newly prepared probe SAM. Other conditions as in Fig. 1.

signals decreased by approximately 40–75% (compared to single targets or double targets) when all four targets are labeled together. The largest signal drop was observed for probe 810, the smallest for probe CRY. Such signal decrease can probably be explained by interferences between the different target and protective strands that are present during the labeling and hybridization processes and may form secondary structures and conjugates. Nevertheless, we are still able to distinguish reliably between maize and GM maize. Our results confirm that multiplexed labeling with  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  is possible. This will be useful to screen for genetic modifications of maize by means of four different capture probes and protective strands. Whereas multiplexed labeling of different targets with the same electroactive marker allows for selective detection on an electrode array, a multicolor label may allow detection of different targets on the same electrode [29]. The combination of both approaches will be interesting for highly parallelized electrochemical detection of many DNA sequences in one sample.

#### 4. Conclusions

We demonstrated that four different target oligonucleotides can be simultaneously modified with  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  in the same vessel (using four different protective strands) without major losses in the electrochemical hybridization signals on probe-modified Au electrodes. Reliable discrimination between maize and GM maize was not affected. Furthermore, we have shown that for the utilized sequences from maize and genetically modified maize, the hybridization temperature was crucial for optimal hybridization signals due to denaturation of secondary structures of the different probes. We consider this a promising approach for future electrochemical

biosensor arrays designed to discriminate between natural and genetically modified plants.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support (Grants FL 384/4-2, 7-1, 8-1).

#### References

- [1] T.M. Herne, M.J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 8916.
- [2] S.O. Kelley, E.M. Boon, J.K. Barton, N.M. Jackson, M.G. Hill, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 4830.
- [3] E.M. Boon, D.M. Ceres, T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 1096.
- [4] E.M. Boon, J.K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002) 320.
- [5] E.L.S. Wong, F.J. Mearns, J.J. Gooding, *Sens. Actuator B-Chem.* 111 (2005) 515.
- [6] E.L.S. Wong, J.J. Gooding, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2138.
- [7] J. Wang, R. Polsky, D.K. Xu, *Langmuir* 17 (2001) 5739.
- [8] J. Wang, D.K. Xu, A.N. Kawde, R. Polsky, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5576.
- [9] T. Reske, M. Mix, H. Bahl, G.-U. Flechsig, *Talanta* 74 (2007) 393.
- [10] R. Lai, E.T. Lagally, S.-H. Lee, K.W. Plaxco, A.L. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 4017.
- [11] O. Paenke, A. Kirbs, F. Lisdat, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2656.
- [12] F. Bettazzi, F. Lucarelli, I. Palchetti, F. Berti, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 93.
- [13] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 63.
- [14] E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 261.
- [15] J.J. Gooding, *Electroanalysis* 14 (2002) 1149.
- [16] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1192.
- [17] P. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castanon, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 104.
- [18] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 139.
- [19] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8 (1981) 497.

- [20] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* 1 (1982) 53.
- [21] E. Palecek, M.A. Hung, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 236.
- [22] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* 3 (1984) 175.
- [23] E. Palecek, *Methods Enzymol.* 212 (1992) 139.
- [24] E. Palecek, M. Trefulka, M. Fojta, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 359.
- [25] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2125.
- [26] M. Mix, T. Reske, H. Duwensee, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* 21 (2009) 826.
- [27] H. Sopha, F. Wachholz, G.-U. Flechsig, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1614.
- [28] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* 19 (2007) 1356.
- [29] M. Fojta, P. Kostecka, M.R. Trefulka, L. Havran, E. Palecek, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1022.
- [30] W.E. Weber, T. Bringezu, I. Broer, J. Eder, F. Holz, J. Agron. *Crop Sci.* 193 (2007) 79.
- [31] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, *Langmuir* 21 (2005) 7848.

## **Publikation 6**

Mix M, Ruger J, Kruger S, Broer I, Flechsig G-U: Electrochemical detection of 0.6 percent genetically modified maize MON810 in real flour samples. *Electrochem. Comm.* 22; 2012; 137-140

(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2012.06.019>)



## Electrochemical detection of 0.6% genetically modified maize MON810 in real flour samples

Maren Mix<sup>a</sup>, Julia Rüger<sup>a</sup>, Simone Krüger<sup>a</sup>, Inge Broer<sup>b</sup>, Gerd-Uwe Flechsig<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Rostock, Dept. of Chemistry, D-18051 Rostock, Germany

<sup>b</sup> University of Rostock, Dept. of Land Use, D-18051 Rostock, Germany

<sup>c</sup> Gensoric GmbH, Schillingallee 68, D-18057 Rostock, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 April 2012

Received in revised form 11 June 2012

Accepted 11 June 2012

Available online 20 June 2012

#### Keywords:

Electrochemical DNA sensor

Hybridization

Gold electrode

Osmium tetroxide bipyridine

Real sample

Maize MON810

### ABSTRACT

We demonstrate an approach for the electrochemical detection of genetically modified maize in real maize flour samples by means of square-wave voltammetry (SWV). After labeling the asymmetric PCR-amplified targets with osmium tetroxide bipyridine [OsO<sub>4</sub>(bipy)], they were hybridized with immobilized oligonucleotide probes on gold electrodes. We could detect the maize genes *ivrp* and *SSIb* in near isogenic maize. The transgene *cryIa/b* and the MON810 specific fragment were detected in all transgenic maize samples, down to a content of 0.6% of MON810 in mixed samples. While it was possible to detect all sequences in the samples containing 100% near isogenic or respectively transgenic maize after a hybridization time of less than 10 min, a hybridization time of 30 min was necessary for the detection of the genetic modifications in samples containing only 0.9 to 0.6% of transgenic maize. No significant detection of the transgene *cryIa/b* or MON810 was possible when only 0.5% of transgenic maize was present in the sample, most likely due to insufficient amplification of the template DNA.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recently, electrochemical detection of nucleic acid hybridization has become a useful tool besides classical molecular-biological methods with optical detection such as classical PCR, real time PCR, Southern or Northern blots. The electrochemical transduction can be performed using covalent labels, intercalators or ions interacting electrostatically with the DNA. Exploiting the electrochemical activity of the DNA is also possible.

Self-assembled monolayers of capture probes [1–3] and magnetic beads [4,5] can be found frequently for electrochemical hybridization assays.

Other approaches for the electrochemical hybridization detection of PCR products or oligonucleotides by means of methylene blue [6,7] or sandwich hybridization with an alkaline phosphatase conjugate on biotinylated signaling probes [8] were reported. The different methods of electrochemical hybridization detection have been reviewed several times, among others by Palecek and Bartosik [9] and Batchelor-McAuley et al. [10]. Recently, we have reviewed the various electrochemical DNA assays for real samples [11].

The complex [OsO<sub>4</sub>(bipy)] can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label as it has been described by Palecek over the

past 30 years [12]. This compound reacts with the pyrimidine bases [13] under oxidation of the C–C-double bond in the pyrimidine ring forming a diester of osmic (VI) acid. This modification can be easily accomplished with single-stranded oligonucleotides or PCR products as we have described earlier [14,15]. This label yields high and reversible voltammetric signals [13], also in hybridization assays with peptide nucleic acids [16]. Adsorptive stripping voltammetric responses of various osmium tetroxide-modified nucleic acids species at different electrode materials have been compared recently [17]. Intact double-stranded DNA does not react with [OsO<sub>4</sub>(bipy)]. On the other hand, a single strand, thoroughly modified with [OsO<sub>4</sub>(bipy)] at all pyrimidine bases, cannot hybridize with its complementary strand. The complex can thus be used to explore the structure of nucleic acids and even single base mismatches [18,19]. These properties are also exploited when protective strands are introduced to protect a certain recognition site within the target strand [14,20].

The common PCR protocols must be modified accordingly. Asymmetric PCR with one primer in large excess yields double-stranded as well as single-stranded PCR products, which can be modified with [OsO<sub>4</sub>(bipy)] (after protecting the sequence complementary to the probe with a protective strand) followed by hybridization with surface-confined capture probes and voltammetric detection [15].

Our group reported also about [OsO<sub>4</sub>(bipy)] as an electrochemically reversible covalent DNA-label on PCR products together with thiol-linked probe oligonucleotides on gold electrodes [21].

Besides single-stranded DNA, tRNA can also be labeled with [OsO<sub>4</sub>(bipy)] [22]. In addition, the temperature influence upon the

\* Corresponding author at: University of Rostock, Dept. of Chemistry, D-18051 Rostock, Germany. Tel.: +49 381 4986470; fax: +49 381 4986461.

E-mail address: [gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de](mailto:gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de) (G.-U. Flechsig).

hybridization process using protective strands has been characterized earlier [23].

Here, we describe a simple approach for covalent labeling of target sequences designed to detect amounts of genetically modified maize MON810 below the threshold defined for labeling of products containing GMO of 0.9% in real maize flour samples.

## 2. Experimental

### 2.1. Material

2,2'-Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide was obtained as a 2% aqueous solution from Fluka. All DNA oligonucleotides (*probes, primer and protector strands*) were delivered by Friz Biochem (Neuried, Germany). The "tris-buffer" contained 10 mmol/l tris-(hydroxymethyl)-aminomethane and 0.5 mol/l sodium sulfate and was adjusted to pH 7.5 using sulfuric acid. The sequences of all DNA-strands together with their length and designations are given in Table 1. All *protector* oligonucleotides contained 3 to 5 mismatches (underlined in Table 1) to ease their later displacement by the immobilized capture probes.

### 2.2. Preparation, modification, and detection of targets

DNA extraction was performed from a 200 mg sample of powdered maize by means of "High Pure GMO Sample Preparation Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. For the preparation of DNA samples with different amounts of transgenic DNA we mixed the two powdered maize samples (wild type and MON810) in the given ratio before the extraction of DNA. Approximately 100 ng of the genomic DNA was used as template DNA for the PCR. The asymmetric PCR (1 × 95 °C, 2 min; 40 × [95 °C, 45 s, 59 °C or 60 °C, 45 s, 72 °C, 30 s]; 1 × 72 °C, 7 min) was performed with 0.4 μmol/l dNTPs, 1 μmol/l of the primer excess primer, 0.1 μmol/l of the second primer (Table 1), and 2.5 U Sawady-Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in 50 μl reaction volume according to the manufacturer's instructions to create single-stranded (ss) DNA. For the labeling, 200 μl of the PCR-solution (containing the single-stranded target) was used without further purification. The ss-target at its maximum concentration (~20 nmol/l) and the respective protective strand (10 μmol/l working concentration) were

mixed and left for 2 h at room temperature to allow hybridization. Labeling with the complex [OsO<sub>4</sub>(bipy)] and dialysis were performed as described earlier [15]. After the dialysis, the purified solution (containing the osmium-labeled target) was used for the hybridization experiments.

The probes SSIIb and ivrp were used to detect genes from maize and therefore served as a positive control. The probe CRY detects the existence of the cryIa/b transgene within the sample and the probe 810 detects the event specific junction between the maize DNA and the inserted transgene [24]. The sequences are given in Table 1.

The preparation of SAM-modified gold electrodes, the hybridization and dehybridization procedures, and the electrochemical measurements have been described in more detail earlier [21]. Briefly, the electrochemical detection using Autolab PGSTAT 12 was performed by square-wave-voltammetry at 200 Hz in a potential range (−500 to +50 mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl) allowing reversible switching between Os(VI) and Os(IV) while not affecting label stability.

## 3. Results and discussion

Fig. 1 displays the square wave-voltammetric (SWV) hybridization signals of the capture probes ivrp (Fig. 1A) and 810 (Fig. 1B) with the respective PCR-amplified and [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labeled targets. Fig. 1A and B shows the effect of hybridization time when the appropriate primer is used in excess (triangles). The hybridization signals increase up to 30 and 15 min of hybridization time in Fig. 1A and B, respectively, in a linear manner. Then, the slope declines. In Fig. 1A and B the effect of hybridization time is also depicted for a non-complementary target (squares). To ensure the comparability of the experiments, the same PCR-reaction was used to create the targets, yet, the respective other primer was used in excess to create a non-complementary target. It can be seen that no significant hybridization signals could be obtained by the hybridization of the probes with their respective non-complementary targets. Similar results could be obtained with the probes SSIIb and CRY (data not shown).

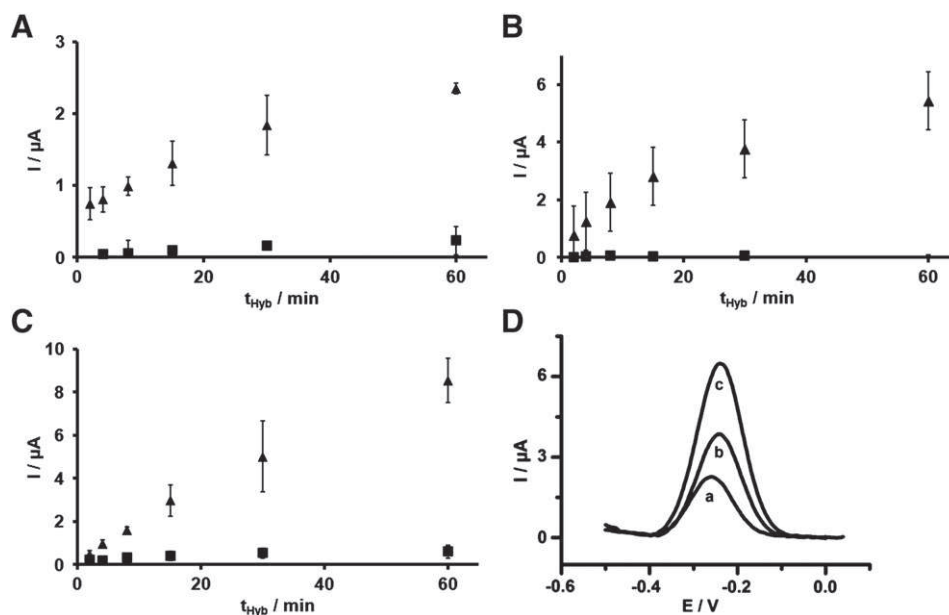
Experiments with artificial oligonucleotide targets ivrp and 810 revealed a significant difference of hybridization behavior between ivrp and 810 at 40 °C [25]. Sequence ivrp showed much lower signals compared to 810, SSIIb and CRY, an effect that did not appear at 50 °C. A similar behavior could be observed in the present study when PCR-amplified targets of sequences ivrp and 810 were used. The hybridization signals for sequences 810 (triangles) and ivrp (squares) at 40 °C are displayed in Fig. 1C. It can be seen that even after only 4 min of hybridization time, the hybridization signals of 810 are about 5 times higher compared to ivrp. For sequence ivrp, no significant increase of the hybridization signal can be observed even after 60 min of hybridization time. The formation of secondary structures seems to be even more distinctive in the PCR-amplified target than in the model oligonucleotide targets, where after 60 min of hybridization, the hybridization signals were only 2 times higher in 810 compared to ivrp [25]. Fig. 1D displays the original SWV signals of sequence 810 at 50 °C obtained after 4, 30 and 60 min.

In order to confirm that the differentiation between maize and GM maize is possible, the PCR of the targets 810 and CRY was performed on near isogenic (isogenic DNA according to possibilities of detecting transgenic DNA in it) DNA. No signals for CRY and only marginal signals for 810 could be observed (data not shown). Therefore a differentiation between maize and GM maize is possible in real samples.

All experiments described so far were performed using either 100% near isogenic or 100% GMO DNA. The labeling threshold for GMO defined by the European Commission is 0.9% of transgenic DNA in a conventional harvest. To verify, whether our new method can be used to detect this limit, we created maize flour samples containing 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6% and 0.5% of GM maize in near isogenic samples. Fig. 2 demonstrates the results (Fig. 2A for probe CRY and Fig. 2B for probe 810). We found that no significant SWV hybridization signals were

**Table 1**  
Sequences of deoxyoligonucleotides.

Designation	Length	Sequence
Probe ivrp	29 + 15 a	5'-CACGTGAGAATTTCCGTCTACTCGAGCCT- aaaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Primer ivr7	18	5'-CGCTCTGTACAAGCGTGC-3'
Primer ivr8 (excess primer)	21	5'-GCAAAGTGTGTGCTGGACC-3'
Protector ivrp	29	5'-CAGCTGAGAATTTCCGTCTAGTGCAGCCT-3'
Probe SSIIb	25 + 15 a	5'-AGC <sup>u</sup> AAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA- aaaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Primer SSIIb 1-5'	22	5'-CTCCAATCCTTTGACATCTGC-3'
Primer SSIIb 1-3' (excess primer)	23	5'-TCGATTTCTCTCTGGTGACAGG-3'
Protector SSIIb	25	5'-ACGAAAGTCAGAGCGCTCGAATGGA-3'
Probe CRY	26 + 15 a	5'-AGATACCAAGCGCCATGGACAACAA- aaaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Primer MON810 2-5'	22	5'-GATGCCTTCTCCCTAGTGTGA-3'
Primer MON810 2-3' (excess primer)	21	5'-GGATGCACTCGTTGATGTTG-3'
Protector CRY	26	5'-AGATAGCAAGCGCCATGCAGAAGAA-3'
Probe 810	23 + 15 a	5'-AACATCCTTTGCCATTGCCAGC- aaaaaaaaaaaaaa[Dithio]3-3'
Primer Mail-F1	24	5'-TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT-3'
Primer Mail-R1 (excess primer)	24	5'-GCCACCTTCCTTTCCACTATCTT-3'
Protector 810	23	5'-AACATCCTTTGCCATTCCCAAG-3'



**Fig. 1.** Influence of hybridization time upon SWV signals: (A) probe ivrp with complementary PCR-amplified target ivrp (triangles) and with non-complementary PCR-amplified target ivrp (squares), (B) probe 810 with complementary PCR-amplified target (triangles), and with non-complementary PCR-amplified target (squares), (C) probe 810 with complementary PCR-amplified target (triangles) and probe ivrp with complementary PCR-amplified target ivrp (squares) at 40 °C, (D) SWV signals of sequence 810 after 4 min [a], 30 min [b] and 60 min [c], signals were Sawitzky and Golay-smoothed and baseline-corrected; covalent labeling of targets with [OsO<sub>4</sub>(bipy)], SWV conducted in Tris-buffer at 200 Hz and 40 mV amplitude. The error bars indicate standard deviations of three repetitive measurement series, each obtained with a newly prepared probe SAM and target.

obtained with 0.5% transgenic maize for both probes. This can be addressed most likely to an insufficient PCR amplification of that small amount of templates. However, we obtained significant results for both sequences from samples containing 0.6% to 0.9% of transgenic maize. For optimal differentiation between the different amounts of

transgenic DNA in the samples, a hybridization time of 30 to 60 min seemed to be necessary.

#### 4. Conclusion

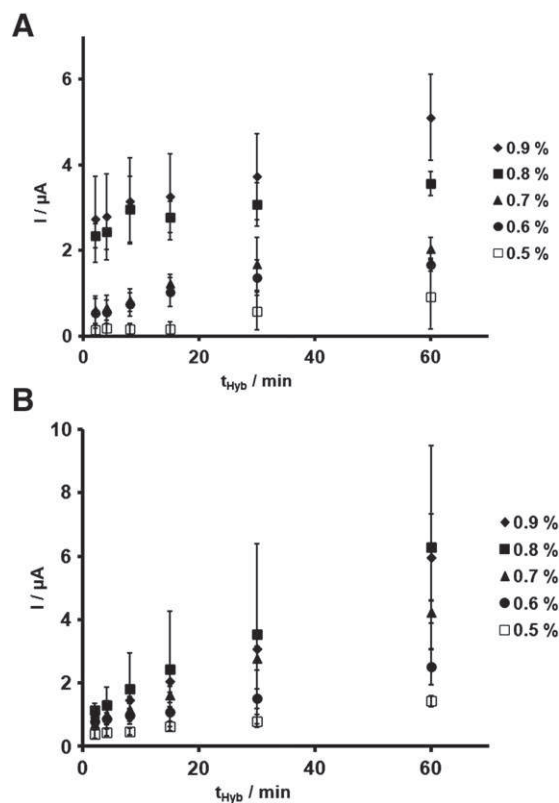
We have demonstrated that the electrochemical detection of 0.6% GM maize with asymmetric PCR-amplified [OsO<sub>4</sub>(bipy)]-labeled targets can be achieved. We also found that, when working with real samples, the optimal hybridization temperature seems to be even more crucial than for artificial model oligonucleotides that we used earlier [25]. Furthermore, we have shown that the threshold of 0.9% of transgenic plant material in a product could be monitored after 4 to 8 min of hybridization time, although 30 min will be necessary to detect less than 0.9% of transgenic DNA. Less than 0.5% of transgenic DNA within the near isogenic sample could not be detected due to insufficient amplification of the target within the asymmetric PCR or the insufficient sensitivity of the electrode. Nevertheless, we consider this as an interesting and promising approach for the development of a sensitive electrochemical biosensor for the detection of transgenic sequences in real plant samples.

#### Acknowledgment

The authors are grateful to the German Research Foundation (DFG, FL 384/11-1, Heisenberg Fellowship FL 384/7-1), and to the Federal Ministry for Education and Research (BMBF) for financial support.

#### References

- [1] S. Campuzano, F. Kuralay, M.J. Lobo-Castanon, M. Bartosik, K. Vyavahare, E. Palecek, D.A. Haake, J. Wang, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 3577.
- [2] F. Kuralay, S. Campuzano, D.A. Haake, J. Wang, *Talanta* 85 (2011) 1330.
- [3] D. Mandler, S. Kraus-Ophir, *Journal of Solid State Electrochemistry* 15 (2011) 1535.
- [4] J. Wang, R. Polsky, D.K. Xu, *Langmuir* 17 (2001) 5739.
- [5] J. Wang, D.K. Xu, A.N. Kawde, R. Polsky, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5576.
- [6] F. Ahour, M.H. Pournaghi-Azar, M.S. Hejazi, *Analytical Methods* 4 (2012) 967.
- [7] M.K. Patel, P.R. Solanki, S. Khandelwal, V.V. Agrawal, S.G. Ansari, B.D. Malhotra, *Journal of Physics: Conference Series* 358 (2012) 012009 (9 pp.).
- [8] F. Bettazzi, F. Lucarelli, I. Palchetti, F. Berti, G. Marrazza, M. Mascini, *Analytica Chimica Acta* 614 (2008) 93.
- [9] E. Palecek, M. Bartosik, *Chemical Reviews* 112 (2012) 3427.



**Fig. 2.** Hybridization signals of targets (A) CRY and (B) 810 with different amounts of DNA from transgenic maize; hybridization was performed at 50 °C; all other parameters as in Fig. 1.

- [10] C. Batchelor-McAuley, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 3183.
- [11] H. Duwensee, M. Mix, G.-U. Flechsig, *Bioanalytical Reviews* 2 (2010) 103.
- [12] E. Palecek, M.A. Hung, *Analytical Biochemistry* 132 (1983) 236.
- [13] E. Palecek, *Methods in Enzymology* 212 (1992) 139.
- [14] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 2125.
- [15] M. Mix, T. Reske, H. Duwensee, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* 21 (2009) 826.
- [16] E. Palecek, M. Trefulka, M. Fojta, *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 359.
- [17] M. Trefulka, N. Ferreyra, V. Ostatna, M. Fojta, G. Rivas, E. Palecek, *Electroanalysis* 19 (2007) 1334.
- [18] M. Fojta, P. Kostecka, H. Pivonkova, P. Horakova, L. Havran, *Current Analytical Chemistry* 7 (2011) 35.
- [19] P. Kostecka, L. Havran, M. Bittova, H. Pivonkova, M. Fojta, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 197.
- [20] M. Fojta, P. Kostecka, M.R. Trefulka, L. Havran, E. Palecek, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 1022.
- [21] T. Reske, M. Mix, H. Bahl, G.-U. Flechsig, *Talanta* 74 (2007) 393.
- [22] H. Sopha, F. Wachhoz, G.-U. Flechsig, *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 1614.
- [23] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* 19 (2007) 1356.
- [24] W.E. Weber, T. Bringezu, I. Broer, J. Eder, F. Holz, *Journal of Agronomy and Crop Science* 193 (2007) 79.
- [25] H. Duwensee, M. Mix, I. Broer, G.-U. Flechsig, *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 1487.

## **Publikation 7**

Flechsig G-U, Mix M, Krüger S: Verfahren und Vorrichtung zur sequenzspezifischen Analyse von Nukleinsäuren. DE-Patent 10 2011 114 984 B3 (2011)





(10) **DE 10 2011 114 984 B3** 2012.11.22

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2011 114 984.1**  
(22) Anmeldetag: **28.09.2011**  
(43) Offenlegungstag: –  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **22.11.2012**

(51) Int Cl.: **C12Q 1/68 (2011.01)**

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**Universität Rostock, 18055, Rostock, DE**

(74) Vertreter:  
**Uexküll & Stolberg, 22607, Hamburg, DE**

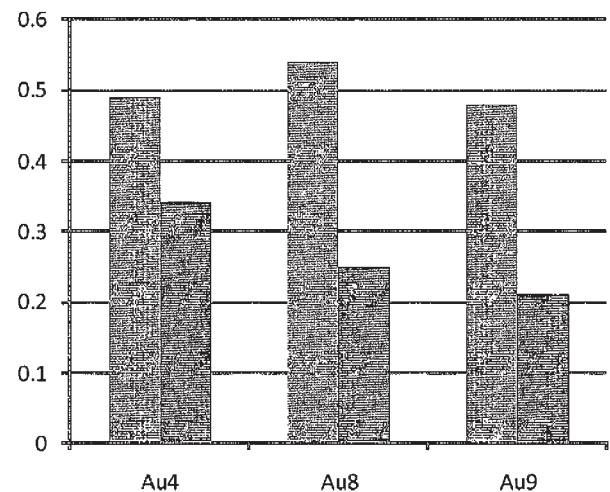
(72) Erfinder:  
**Flechsig, Gerd-Uwe, Dr. rer. nat., 17166, Teterow, DE; Mix, Maren, 18057, Rostock, DE; Krüger, Simone, 18059, Rostock, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

**DE 10 2009 044 795 B3**  
**WO 2005/ 005 952 A2**

(54) Bezeichnung: **Sequenzspezifische Analyse von Nukleinsäuren**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur sequenzspezifischen Analyse von Nukleinsäuren in einer Probe, in der die Nukleinsäure zumindest partiell als Doppelstrang vorliegt, welches elektrochemische Detektionsverfahren (z. B. mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ ) nutzt. Insbesondere umfassen die Verfahren Schritte bei denen man die zumindest partiell doppelsträngigen Nukleinsäurestränge durch thermische Denaturierung in Einzelstränge überführt, welche als Targetstränge bezeichnet werden, und mindestens einen als Schutzstrang bezeichneten Nukleinsäurestrang hinzufügt, welcher mit einem Targetstrang hybridisieren kann, um partielle Doppelstrangabschnitte auszubilden, wobei die Schutzstränge kürzer als die Targetstränge sind, wobei die Temperatur der Probe schnell auf eine Temperatur von unter  $5^\circ\text{C}$ , bevorzugt weniger als  $0^\circ\text{C}$  gesenkt wird. Die Erfindung betrifft auch Vorrichtungen, die für diese Verfahren geeignet sind, umfassend ein Fließsystem, in welchem die Schritte des Verfahrens nacheinander stattfinden können, mit heizbaren Abschnitten zur thermischen Denaturierung sowie kühlbaren Abschnitten zur schnellen Kühlung der Probe.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur sequenzspezifischen Analyse von Nukleinsäuren in einer Probe, in der die Nukleinsäure zumindest partiell als Doppelstrang vorliegt, welches elektrochemische Detektionsverfahren (z. B. mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ ) nutzt. Insbesondere umfassen die Verfahren Schritte, bei denen man die zumindest partiell doppelsträngigen Nukleinsäurestränge durch thermische Denaturierung in Einzelstränge überführt, welche als Targetstränge bezeichnet werden, und mindestens einen als Schutzstrang bezeichneten Nukleinsäurestrang hinzufügt, welcher mit einem Targetstrang hybridisieren kann, um partielle Doppelstrangabschnitte auszubilden, wobei die Schutzstränge kürzer als die Targetstränge sind, wobei die Temperatur der Probe schnell auf eine Temperatur weniger als  $0^\circ\text{C}$  gesenkt wird. Die Erfindung betrifft auch Vorrichtungen, die für diese Verfahren geeignet sind, umfassend ein Fließsystem mit heizbaren Abschnitten zur thermischen Denaturierung sowie kühlbaren Abschnitten zur schnellen Kühlung der Probe, in welchen die Schritte des Verfahrens nacheinander stattfinden können.

## Stand der Technik

**[0002]** Um eine elektrochemische Detektierung von Hybridisierungsereignissen von Nukleinsäuren zu ermöglichen, können redoxaktive Moleküle eingesetzt werden, die entweder an den Target- oder Reporterstrang kovalent gebunden sind, sich elektrostatisch an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren binden oder sich als Interkalatoren in den Doppelstrang einlagern. Die kovalent gebundenen so genannten Redoxmarker werden bei der Markierung oder Herstellung der Target- oder Reporterstränge angebonden. Alternativ kann Osmium(VIII)oxid in Form von Komplexen mit Bipyridin eingesetzt werden. Diese Komplexverbindungen reagieren spezifisch mit den Pyrimidinbasen Thymin, Uracil und in weitaus geringerem Maße mit Cytosin. Diese Reaktion findet in einem intakten Doppelstrang nicht statt. Andererseits können Einzelstränge, deren Pyrimidinbasen mit Osmiumkomplexen reagiert haben, keine Doppelstränge mehr bilden. Diese Zusammenhänge wurden seit Anfang der 80er Jahre von Palecek, Jelen und Fojta untersucht und in Form zahlreicher Beispiele zur Detektion der Nukleinsäuren verwendet (M. Foita et al. J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 6532; P. KostECKA et al. Bioelectrochemistry 63 (2004) 245; M. Foita et al. Electroanalysis 15 (2003) 431).

**[0003]** Die Modifikation von DNA mittels Osmium(VIII)-Komplexen kann sehr einfach durch Zugabe des Osmiumreagenzes zur Analysenlösung erfolgen. Nach der Modifizierung wird das überschüssige Reagenz durch Dialyse in handelsüblichen einfachen Dialysegefäßen abgetrennt. Weiterhin wird üblicherweise die Hybridisierung von Target und Sonde an unterschiedlichen Oberflächen durchgeführt. Besonders geeignet sind so genannte Magnetic Beads, magnetische Kügelchen, welche an ihrer Oberfläche immobilisierte Sondenstränge tragen und mittels Magnetfeld von der Analysenlösung (und damit von nicht komplementären Strängen und Analysereagenzien) getrennt werden können. Nach diesem Prinzip kann man beliebige einzelsträngige Nukleinsäurestränge markieren. Nukleinsäuren in der Mehrzahl der Proben liegen jedoch in doppelsträngiger Form vor. Dies gilt sowohl für DNA als auch für RNA; welche aufgrund von Sekundärstrukturen in großen Teilen doppelsträngig ist.

**[0004]** Es besteht das Problem, dass einerseits osmiummodifizierte Nukleinsäureeinzelstränge nicht mehr zur Doppelstrangbildung fähig sind, und dass andererseits intakte Doppelstränge nicht mit den Osmiumtetroxid-Komplexen wie dem  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  reagieren. Es wurden im Stand der Technik verschiedene Wege gefunden, dieses Problem zu lösen.

**[0005]** Dies kann dadurch gelöst werden, dass ein Schutzstrang den Teil des Einzelstranges blockiert, der später mit einer Sonde hybridisieren soll. Auf diese Weise gelingt die Markierung von PCR-Produkten oder nativen Nukleinsäureproben mit Osmium, ohne dass die Fähigkeit zur Hybridisierung verloren geht. Die große Zahl der an die Targetstränge gebundenen Osmiumeinheiten bewirkt eine sehr hohe Empfindlichkeit bei der anschließenden elektrochemischen Analyse (WO 2007/020093 A2). Dort wurden z.B. mit einer PCR amplifizierte Doppelstränge thermisch denaturiert ( $95^\circ\text{C}$ ), der Schutzstrang im Überschuss zugesetzt und auf  $35^\circ\text{C}$  abgekühlt. Es wird gelehrt, dass die optimale Hybridisierungstemperatur unterhalb der Schmelztemperatur liegt und mit einer Schmelzkurvenanalyse festgestellt werden kann.

**[0006]** Der erste große Vorteil einer Markierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Osmiumtetroxidkomplexen besteht in der einfachen Durchführung. Man muss lediglich die DNA/RNA-haltige Lösung mit dem Komplex, z. B.  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  versetzen, dann reagiert diese Verbindung spontan mit allen Thymin-Basen in der Lösung, die nicht in DNA-Doppelsträngen vorliegen. Auch andere Pyrimidinbasen werden auf diese Weise angegriffen. Cytosin reagiert allerdings etwa 10-mal langsamer als Thymin. In der RNA tritt die Pyrimidinbase Uracil an

die Stelle des Thymins. Sie unterscheidet sich vom Thymin lediglich durch eine fehlende Methylgruppe und reagiert etwas langsamer mit Osmiumtetroxid-Bipyridin.

**[0007]** Der zweite große Vorteil ist die hohe Empfindlichkeit, die erreicht wird, wenn der Targetstrang viele Thymin- bzw. Uracilbasen enthält. Denn der größte Teil hiervon wird stets im Einzelstrangabschnitt auftreten und damit vom  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  angegriffen werden. Im Schnitt kann man bei einem PCR-Produkt mit 50 bis 200 Thyminbasen pro Strang rechnen. RNA kann über 500 Uracilbasen enthalten.

**[0008]** Flechsig et al., Anal. Chem. 2007, zeigen, dass eine Hybridisierung von Einzelsträngen mit Schutzsträngen optimal bei 40°C abläuft. Reske et al., Talanta 2007, analysierten doppelsträngige PCR-Produkte nach Generierung von Einzelsträngen durch Lambda-Exonuklease-Behandlung, vor Hybridisierung der Einzelstränge mit kurzen Schutzsträngen bei Raumtemperatur (RT) für 2 h und anschließender Reaktion mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  für 2 h bei RT.

**[0009]** Mix et al., Electroanalysis 2009, beschreiben die Herstellung einzelsträngiger DNA-Stränge durch asymmetrische PCR, gefolgt wiederum von Hybridisierung der Einzelstränge mit kurzen Schutzsträngen bei Raumtemperatur (RT) für 2 h und anschließender Reaktion mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  für 2 h bei RT.

**[0010]** Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren und eine Vorrichtung zu schalten, welche eine schnelle und einfache Detektion der gesuchten Nukleinsäuresequenzen mit Redoxmarkern wie Osmiumtetroxid-Komplexen gegebenenfalls auch ohne vorherige PCR ermöglichen, sowie direkt anschließend die elektrochemische Detektierung an einer Arbeitselektrode gestatten, wobei auf eine asymmetrische PCR, Exonuklease-Verdau oder ähnliche Verfahren zur Generierung von Einzelsträngen verzichtet werden kann. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die gesuchten Sequenzen in der Probe zumindest partiell als Doppelstränge vorliegen, z. B. in Gegenwart eines großen Überschusses an unspezifischer DNA bzw. RNA. Doppelsträngige DNA lässt sich vor der Detektion oft vorteilhaft durch eine klassische, symmetrische PCR vervielfältigen, welche eine bessere Ausbeute ergibt als asymmetrische PCR, und damit zu einer verbesserten Selektivität und Empfindlichkeit führt.

#### Lösung der Aufgabe

**[0011]** Gelöst wird diese Aufgabe durch den Gegenstand der Ansprüche insbesondere durch ein Verfahren zum sequenzspezifischen Nachweis von Nukleinsäure in einer Probe, in der die Nukleinsäure zumindest partiell als Doppelstrang vorliegt, welches Schritte umfasst, bei denen man

- a) die zumindest partiell doppelsträngigen Nukleinsäurestränge durch thermische Denaturierung in Einzelstränge überführt, welche als Targetstränge bezeichnet werden,
- b) mindestens einen als Schutzstrang bezeichneten Nukleinsäurestrang hinzufügt, welcher mit einem Targetstrang hybridisieren kann, um partielle Doppelstrangabschnitte auszubilden, wobei die Schutzstränge kürzer als die Targetstränge sind, wobei die Temperatur der Probe schnell auf eine Temperatur von weniger als 5°C, bevorzugt weniger als 0°C, gesenkt wird,
- c) die verbliebenen Einzelstrangabschnitte der Targetstränge durch Reaktion mit einem Redoxmarker markiert, der selektiv mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe der Nukleinsäurestränge reagieren und eine elektroanalytisch nutzbare Redoxreaktion an Arbeitselektroden ermöglicht, man
- d) die so markierten Nukleinsäurestränge an der Oberfläche einer Elektrode mit dort immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge hybridisiert und man
- e) die an den Sondensträngen hybridisierten Nukleinsäurestränge elektroanalytisch nachweist.

**[0012]** Das Grundprinzip der vorliegenden Erfindung besteht darin, sämtliche Nukleinsäuren (DNA und/oder RNA) einer Probe zu Einzelsträngen zu denaturieren und die unspezifischen (nicht gesuchten) Abschnitte mit Osmiumtetroxid-Komplexen zu blockieren, so dass sie nicht mehr zur Hybridisierung in der Lage sind. Die gesuchten Sequenzen werden dagegen auf an sich bekannte Weise mit kurzen Schutzsträngen geschützt (s. a. DE 10 2005 039 726 B3 oder WO 2007/020093 A2).

**[0013]** Erfindungsgemäß wird dabei die unterschiedliche Hybridisierungsgeschwindigkeit verschieden langer Nukleinsäurestränge ausgenutzt. So bleiben die langen DNA und RNA-Stränge nach beispielsweise thermischer Denaturierung und Abschrecken im Eisbad oder Kältemischung für längere Zeit als Einzelstränge erhalten, während die kurzen Schutzstränge (typischerweise 20 bis 30 Basen) sehr viel schneller hybridisieren können. Durch thermisches Aufschmelzen der Doppelstrang-DNA und anschließendes schnelles Abkühlen können die langen Einzelstränge längere Zeit wegen der kinetischen Hemmung nicht rehybridisieren. Ein Vergleich

mit Reske, Dissertation, 2009, zeigt, dass erst ein sehr schnelles Abkühlen auf niedrige Temperatur, verbunden mit entsprechendem ausreichend langen Halten der hohen bzw. niedrigen Temperatur zum Erfolg führt.

**[0014]** Im Rahmen der Erfindung werden in dieser Phase Schutzstränge hinzugefügt, die kurze Doppelstrangabschnitte bilden können. Die so geschützten Abschnitte werden bei der darauf folgenden Modifizierung mit Osmiumtetroxid-Komplexen nicht angegriffen und stehen später für die Hybridisierung mit Fängersonden zur Verfügung. Alle übrigen DNA- oder RNA-Abschnitte liegen nach wie vor als Einzelstränge vor und werden nun mittels Osmiumtetroxid-Komplexen modifiziert. Diese Einzelstrangabschnitte sind nun nicht mehr zur Hybridisierung fähig.

**[0015]** Auf diese Weise lassen sich erfindungsgemäß alle ungeschützten DNA- oder RNA-Abschnitte ausblenden, wenn es anschließend um die Hybridisierung mit Fängersonden an Goldelektroden geht. Es wird die unspezifische Anlagerung von nicht komplementären Nukleinsäuresträngen an die Sondenstränge erschwert. Die Erkennung der Targetstränge in einem Überschuss an nichtkomplementären Nukleinsäuresträngen wird daher erleichtert. Erfindungsgemäß erfolgt zweimal eine Selektion der gesuchten Nukleinsäuresequenz: Bei der Hybridisierung mit den Schutzsträngen sowie bei der Hybridisierung mit den immobilisierten Fängersonden.

**[0016]** Bevorzugt findet in dem erfindungsgemäßen Verfahren die thermische Denaturierung in Schritt a) bei mindestens 93°C, bevorzugt bei 95°C oder 97°C für mindestens 5 min, bevorzugt für mindestens 10 min statt. Besonders bevorzugt findet eine thermische Denaturierung bei 95°C für mindestens 10 min statt.

**[0017]** Das Hinzufügen des Schutzstranges in Schritt b) erfolgt erfindungsgemäß etwa bei der Temperatur der thermischen Denaturierung. Insbesondere kann es genau bei dieser Temperatur erfolgen oder direkt nachdem die Probe einer Umgebung dieser Temperatur entnommen wurde. Die Temperatur der Probe beim Hinzufügen des Schutzstranges ist also bevorzugt etwa 80–95°C, besonders bevorzugt etwa 90–95°C.

**[0018]** In einer Ausführungsform sind die Zeiten für Denaturierung der Doppelstrang-Abschnitte der DNA- oder RNA-Targets und für die Hybridisierung mit Schutzsträngen länger als 1 min, bevorzugt mindestens 5 min oder mindestens 10 min.

**[0019]** Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Temperatur der Probe anschließend schnell auf eine Temperatur von weniger als 5°C, bevorzugt 0°C oder weniger, mehr bevorzugt auf ca. –1°C bis –5°C, auf –2°C bis –4°C, oder auf –2°C bis –3°C, insbesondere auf etwa –2,5°C, gesenkt, indem die Probe sofort nach Hinzufügen des Schutzstrangs in Schritt b) in eine Umgebung von 0°C oder weniger überführt wird. Eine schnelle Temperatursenkung kann z. B. durch Transfer des Reaktionsbehälters mit der Probe in eine Umgebung von 0°C oder weniger erreicht werden, z. B. in ein Eisbad. Da die Temperatur der Probe bevorzugt auf weniger als 0°C gesenkt wird, beträgt die Umgebungs-Temperatur in Schritt b) bevorzugt ca. –5°C bis –25°C, bevorzugt etwa –19°C. Solche Temperaturen können z. B. in einer Kältemischung aus Eis und einem Salz erreicht werden, wobei das Salz bevorzugt NaCl ist und die Salzlösung gesättigt ist. Eine derartige Kältemischung kann z. B. eine Temperatur von –19°C aufweisen. Die schnelle Temperatursenkung in Schritt b) wird also durch die geringe Umgebungstemperatur (z. B. in einer Kältemischung) und eine gute Wärmeübertragung (wie z. B. in der Kältemischung) erreicht.

**[0020]** Bevorzugt wird die Temperatur in Schritt b) mindestens 1 min, bevorzugt mindestens 5 min oder mehr bevorzugt mindestens 10 min gehalten. Danach ist eine weitere Hybridisierung der Schutzstränge bei höheren Temperaturen, insbesondere bei RT (ca. 20–25°C) möglich. Dies kann weitere 5–120 min erfolgen, insbesondere 10–110 min oder 30–60 min.

**[0021]** Unter "partiellen Doppelstrangabschnitte", die durch Schutzstrang und Targetstrang in Schritt b) gebildet werden, versteht man, dass die einzelsträngigen Targetstränge nur über einen Teil ihrer Gesamtlänge mit Schutzsträngen hybridisieren und sich dadurch doppelsträngige Abschnitte bilden, d. h., die Länge der Schutzstränge wird so gewählt, dass noch ausreichend lange einzelsträngige Abschnitte der Targetsequenz für die nachfolgende Reaktion mit den Redoxmarkern zur Verfügung stehen. Diese verbleibenden einzelsträngigen Abschnitte der Targetsequenz müssen mindestens eine Thyminbase enthalten. Je mehr Thyminbasen im Einzelstrangabschnitt vorliegen, desto mehr können im anschließenden Schritt mit dem Redoxmarker markiert werden und desto höher werden zum Schluss die elektroanalytischen Signale und damit die Empfindlichkeit des ganzen Verfahrens sein.

**[0022]** Die Hybridisierung erfolgt mit Schutzsträngen, die kürzer als die Targetstränge sind. Insbesondere ist der Schutzstrang höchstens halb so lang wie der Targetstrang, höchstens  $\frac{1}{4}$  so lang oder höchstens  $\frac{1}{10}$  so

lang. Der Schutzstrang weist bevorzugt eine Länge von 10–200 b auf, mehr bevorzugt von 15–100 b oder 20–30 b. Die Länge der Schutzstränge muss dabei ausreichend sein, um eine ausreichend feste Doppelstrangbildung zu ermöglichen. Andererseits erfolgt in Schritt d) eine Hybridisierung mit Sondensträngen, die an der Oberfläche einer Elektrode immobilisiert sind. Da diese Hybridisierung unter Verdrängung der Schutzstränge erfolgt, ist folgendes zu beachten: Die Sondenstränge sollten genauso lang sein wie die Schutzstränge oder nur geringfügig länger. Es ist von Vorteil, wenn im Target-Schutzstrang-Duplex Fehlpaarungen auftreten. Dieser Vorteil kommt insbesondere zum Tragen, wenn die Sondenstränge etwas kürzer als die Schutzstränge sind. Die Fehlpaarungen sollten nicht an Stellen des Targetstranges auftreten, an denen Thymin-Basen sitzen, da diese sonst markiert werden könnten, was eine spätere Hybridisierung mit den Sondensträngen beeinflussen würde. So wird gewährleistet, dass der Targetstrang-Schutzstrang-Duplex nicht stabiler als der Targetstrang-Sondenstrang-Duplex ist, und dass ein Tausch der Schutzstränge gegen die Sondenstränge stattfindet.

**[0023]** Bevorzugt wird in Schritt b) Schutzstrang in einem Überschuss von mindestens 2:1, bevorzugt 3:1, 4:1, 5:1, 9:1 oder 10:1 hinzugefügt.

**[0024]** Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Redoxmarker, der selektiv mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe der Nukleinsäurestränge reagiert und eine elektroanalytisch nutzbare Redoxreaktion an Arbeitselektroden ermöglicht, bevorzugt ein Osmium(VIII)-Komplex, bevorzugt  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  oder  $[\text{OsO}_4(\text{py})_2]$ , insbesondere  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ . Alternative Redoxmarker sind in WO 2007/020093 A2 offenbart.

**[0025]** Die Nukleinsäure in der Probe kann RNA und/oder DNA sein. Sowohl DNA als auch RNA ist im Allgemeinen zumindest partiell doppelsträngig, insbesondere bei Raumtemperatur (ca. 20–25°C). Bei RNA beruht dies insbesondere auf Sekundärstrukturen.

**[0026]** Die Nukleinsäure der Targetstränge kann eine Länge von 100 bis 5000 Basenpaaren, vorzugsweise 500 bis 2000 Basenpaaren aufweisen, oder länger sein. In einer Ausführungsform wird die Nukleinsäure in der Probe vor der Denaturierung in Schritt a) in kürzere Abschnitte geteilt, z. B. von jeweils 100 bis 500 Basenpaaren, vorzugsweise 500 bis 2000 Basenpaaren. Dies kann z. B. mit Nuklease-Behandlung oder durch Ultraschall erreicht werden.

**[0027]** Bevorzugt erfolgt die Verdrängung der Schutzstränge durch die immobilisierten Sondenstränge in Schritt d) bei einer Temperatur, die optimal für die thermisch stringente Hybridisierung von Sonden- und Targetsträngen ist. Bevorzugt sind die Sondenstränge an einer zum Zeitpunkt der Messung und/oder Hybridisierung beheizten Elektrode (Arbeitselektrode) immobilisiert. Dadurch wird einerseits der Strangaustausch an der Elektrodenoberfläche beschleunigt und andererseits die Anbindung von nicht hundertprozentig komplementären Strängen an die Sondenstränge erschwert. Die optimale Temperatur liegt unterhalb der sogenannten Schmelztemperatur. Bei letzterer liegen die beiden komplementären Stränge zu 50% als Doppelstrang vor. Zur Ermittlung der optimalen Temperatur eines jeden Sondenstranges bedient man sich der Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird ein Analysensignal, welches vom Hybridisierungszustand abhängt, gegen die Temperatur aufgetragen. In homogener Lösung werden dazu üblicherweise die UV-Absorption oder die Fluoreszenz der DNA gemessen. Falls gewünscht, können zum Nachweis mehrerer Sequenzen in einer Probe mehrere unterschiedliche Sonden, welche zu den nachzuweisenden Sequenzen komplementär sind, verwendet werden. Bevorzugt sind diese unterschiedlichen Sonden an unterschiedlichen selektiv beheizten Elektroden immobilisiert, um während der Hybridisierung und/oder Messung die für jede Sondensequenz jeweils optimale Temperatur einzustellen.

**[0028]** In einer Ausführungsform werden zwischen Schritt c) und d) die überschüssigen Redoxmarker aus der Analysenlösung entfernt, z. B. durch Dialyse oder Filtration.

**[0029]** Gemäß einer weiteren Verfahrensvariante verbleiben die überschüssigen Redoxmarker nach Schritt c) in der Analysenlösung, d. h. zwischen Schritt c) und d) werden die überschüssigen Redoxmarker aus der Analysenlösung nicht entfernt, und man trennt die elektrochemischen Signale der an der Oberfläche der Elektrode gebundenen Redoxmarker von den Signalen des in Lösung befindlichen Redoxmarkers bei der Detektierung durch geeignete elektrochemische Analyseverfahren voneinander. Bei dieser Verfahrensvariante ist die Chronocoulometrie oder Chronopotentiometrie als elektrochemisches Analyseverfahren bevorzugt. Die Chronocoulometrie gestattet die Unterscheidung zwischen elektrochemischen Diffusionsströmen, welche von der Umsetzung gelöster Substanzen stammen und elektrochemischen Strömen, die von oberflächlich fixierten Substanzen verursacht werden. Auf diese Weise lässt sich z. B. die Menge immobilisierter DNA auf Goldelektroden bestimmen, indem man Rutheniumhexamminchlorid zur Lösung dazu setzt. Dieses bindet sich an die Phosphatgruppen der DNA-Stränge (vgl. z. B. Steel, B. A. et al. Anal. Chem. 1998, 70, 4670–4677).

**[0030]** Gemäß einer Ausführungsform liegen die Sondenstränge in Schritt d) in hybridisierter Form vor, d. h. sie sind mit einem oder mehreren Nukleinsäuresträngen als SONDENSCHUTZSTRÄNGEN hybridisiert. In diesem Fall hybridisiert man in Schritt d) die markierten Targetnukleinsäurestränge an der Oberfläche einer Elektrode mit den dort immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge und der SONDENSCHUTZSTRÄNGE.

**[0031]** Der elektroanalytische Nachweis der Targetstränge, welche an die immobilisierten Sondenstränge angebunden sind, erfolgt im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens vorzugsweise mittels Chronopotentiometrie, Coulometrie, Amperometrie oder Voltammetrie, vorzugsweise mittels Square-Wave-Voltammetrie (SWV), Wechselstromvoltammetrie (ACV) oder cyclischer Voltammetrie (CV). Als Elektrode verwendet man Metall-, Kohle-, Polymer- oder Halbleiterelektroden, vorzugsweise Draht- oder Schichtelektroden, welche aus Gold, Platin, Kupfer, Bismut, Quecksilber, Silber, Blei, Zinn bzw. deren Legierungen bestehen. Bevorzugt kommen Elektroden zum Einsatz, welche mittels elektrischen Stromes direkt oder mittels eines Widerstandsheizers indirekt heizbar sind. Bevorzugt ist eine beheizbare Elektrode direkt beheizbar und weist eine gleichmäßige Oberflächentemperatur auf.

**[0032]** Die Elektrodenoberflächen können mit Strukturen im Nano- oder Mikrometerbereich modifiziert sein, um ihre Oberfläche zu vergrößern. Diese Strukturen können aus dem gleichen Material sein wie die Elektrode selbst. Die Immobilisierung der Sondenstränge auf der Oberfläche der Elektroden erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren. Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, die Sondenstränge auf Metallelektroden vorzugsweise mittels Thiolgruppen zu chemisorbieren (vgl. z. B. Steel, B. A.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. Anal. Chem. 1998, 70, 4670–4677).

**[0033]** Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend ein Fließsystem, in welchem die genannten Schritte des Verfahrens nacheinander stattfinden können, wobei es in dem Fließsystem heizbare Abschnitte zur thermischen Denaturierung sowie kühlbare Abschnitte zur schnellen Kühlung der Probe gibt. Insbesondere ist der Abschnitt zur thermischen Denaturierung auf 93–97°C, bevorzugt 95°C beheizbar oder beheizt. In dem Fließsystem wird der Probe direkt danach Schutzstrang hinzugefügt, d. h., das System ist so ausgestaltet, dass Schutzstrang hinzugefügt werden kann, z. B. durch eine Kanalmündung oder Einspritzvorrichtung. Auch dieser Bereich kann noch auf die Temperatur zur thermischen Denaturierung oder eine leicht darunter liegende Temperatur beheizbar oder beheizt sein. Das Fließsystem ist so ausgestaltet, dass die Probe direkt danach in einen Abschnitt geleitet werden kann, der auf eine Temperatur gekühlt ist, die dazu geeignet ist, die Temperatur der Probe auf von 0°C oder weniger, bevorzugt auf etwa –1°C bis etwa –5°C, –2°C bis –4°C oder etwa –2,5°C zu senken. Der Abschnitt kann dafür z. B. auf –2,5°C bis –25°C oder etwa –5°C bis –19°C kühlbar sein oder gekühlt sein. Der Gefrierpunkt der Probe sollte in der Probe nicht unterschritten werden, während sie diesen gekühlten Abschnitt passiert.

**[0034]** Durch die schnelle Abkühlung der Probe kommen die bereits erläuterten vorteilhaften Effekte bei der Anlagerung der Schutzstränge zum Tragen.

**[0035]** In einer Ausführung umfasst die Vorrichtung eine Probe, welche Nukleinsäuren umfasst, und die oben erwähnten heizbaren und kühlbaren Abschnitte sind auf die entsprechenden Temperaturen geheizt bzw. gekühlt.

**[0036]** In der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird bevorzugt als elektrochemischer Detektor zum elektroanalytischen Nachweis der an den Sondensträngen hybridisierten Nukleinsäurestränge ein Array aus unterschiedlichen selektiv heizbaren Arbeitselektroden verwendet, wobei an den Arbeitselektroden unterschiedliche Sonden (d. h. Sonden mit unterschiedlicher Sequenz) immobilisiert sind.

**[0037]** Da bei diesem Verfahren eine Vervielfältigung der Zielsequenzen nicht nötig ist, sollten in der Probe hinreichend viele Kopien der Zielsequenz vorliegen. Dies ist z. B. zu erwarten im Falle von mRNA, rRNA sowie bei Proben, die sehr viele Zellen enthalten. Selbstverständlich ist das erfindungsgemäße Verfahren auch bei Proben anwendbar, die vorher, z. B. mit PCR oder SDA, amplifiziert worden sind.

**[0038]** Im Rahmen der Erfindung kann eine Probe insbesondere eine biologische oder klinische Probe sein, z. B. ein Nukleinsäuren umfassender Extrakt aus Zellen pflanzlichen, tierischen oder humanen Ursprungs. Die Erfindung kann z. B. vorteilhaft zur Detektion von Nukleinsäuren eines Pathogens in einer klinischen Probe oder zur Detektion von gentechnisch veränderter DNA bekannter Sequenz in einer pflanzlichen oder Nahrungsmittel-Probe eingesetzt werden.

**[0039]** Der wirtschaftliche Nutzen der Erfindung zeigt sich z. B. darin, dass die sequenzspezifische Analytik von DNA und RNA erheblich vereinfacht wird, weil keine PCR mehr erforderlich ist. Es können elektrochemische DNA-Chips zum Einsatz kommen, welche direkt auslesbare digitale Daten liefern. Es können durch Verwendung von Elektrodenarrays sehr viele unterschiedliche Sequenzen parallel detektiert werden. Es sind keine teuren, speziell fluoreszenz-markierten Oligonukleotide mehr nötig. Auch im Falle der Genexpressionsanalysen kann die teure und langwierige PCR-Vervielfältigung entfallen. Außerdem ist eine direkte Quantifizierung gegeben, weil durch Wegfall der PCR die elektrochemischen Signale direkt proportional zur Konzentration der Zielsequenzen sind.

**[0040]** Insbesondere eröffnen sich folgende wirtschaftlich interessante Anwendungen des erfindungsgemäßen Prinzips:

1. Direkte quantitative Detektion einer gesuchten DNA-Sequenz bei großem Überschuss an unspezifischer DNA ohne PCR, beispielsweise zur quantitativen Analyse gentechnisch veränderter Organismen.
2. Schnelle, einfache, kostengünstige elektrochemische Analytik von mRNA-Strängen aus der Genexpression, quantitativ und ohne vorherige PCR.
3. Quantitative, schnelle, einfache, kostengünstige elektrochemische Analytik von Bakterien über deren spezifische rRNA in klinischen Proben,
4. Schnelle, einfache, kostengünstige elektrochemische Multiplex-Detektierung vieler Nukleinsäure-Sequenzen in einer Probe mittels Elektrodenarrays, ohne dass eine kompromissbehaftete Multiplex-PCR nötig wäre,
5. Selektive und sensitive Detektion von PCR-Produkten.

#### Legende

**[0041]** Fig. 1 zeigt die Ergebnisse der Markierung von PCR-Produkten mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  bei unterschiedlichen Methoden der Hybridisierung mit Schutzstrang (siehe Beispiel 1). Linker Balken: Verfahren 1, rechter Balken: Verfahren 2. SWV-Signale in Mikroampere.

**[0042]** Fig. 2(A) zeigt die Methode zur Markierung von PCR-Produkten nach Verfahren 1, (B) zeigt die Methode nach Verfahren 2; 1. zeigt die doppelsträngigen PCR-Produkte; 2. stellt die Stränge nach der Denaturierung dar; 3. zeigt die Situation nach dem Abschrecken, in Verfahren 1 bleiben die Einzelstränge länger von ihren komplementären Strängen getrennt, so dass die Schutzstränge effektiver hybridisieren können; 4. zeigt die Situation nach der Markierung mit  $(\text{OsO}_4[\text{bipy}])$ , es liegen bei Verfahren 1 deutlich mehr markierte Targets vor, die mit den Sonden an der Elektrode hybridisieren können

#### Beispiele

##### Beispiel 1: Markierung von doppelsträngigen PCR-Produkten mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$

**[0043]** Für die Markierung von PCR-Produkten mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  wurden aus einer klinischen Probe, welche *Candida albicans*-DNA enthielt, mehrere identische PCR-Ansätze hergestellt und eine PCR durchgeführt (*Candida albicans*: Primer: S1: 5'-ACTGCGAATGGCTCATTAATCAG-3' (SEQ ID NO:1), CUF1: 5'-CAAGGCCATGCGATTTCG-3' (SEQ ID NO:2); Sonde: V2CA: 5'-TGCCTTCGGGCTCTTTGAAAAA[Dithio]<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO:3); Schutzstrang: Schutz Canda: 5'-TACCTTCAGGCTCTTTAG-3' (SEQ ID NO:4).

**[0044]** Die Hybridisierung mit Schutzsträngen wurde unterschiedlich durchgeführt, nach den im Folgenden beschriebenen Verfahren 1 (erfindungsgemäß) und 2 (erfindungsgemäß modifizierte Methode von Th. Reske):

1. Erfindungsgemäß wurde die Probe im Thermocycler bei 95°C für 10 min denaturiert. Das Gefäß mit Reaktionsmischung wurde dann in eine Kältemischung (Eisbad mit Salz (NaCl)) transferiert und die Reaktionsmischung dadurch sehr schnell auf -2,5°C abgekühlt. Der Schutzstrang wurde zugegeben und für 10 min bei dieser Temperatur inkubiert. Dann wurde für weitere maximal 110 min bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Nach Stand der Technik (Reske, Dissertation 2009, S. 18) wurde die Probe nur kurz bei 95°C für max. 1 min denaturiert. Diese Versuche waren nicht erfolgreich, d. h. es wurden nur sehr kleine Signale erhalten. Erst durch erfindungsgemäße längere Haltezeiten für Denaturierung und Schutzstrang-Hybridisierung konnten brauchbare, aber relativ kleine Signale am Ende erhalten werden. In diesem Beispiel wurde daher schon länger als im Stand der Technik, d. h. erfindungsgemäß für 10 min denaturiert. Danach wurde sie in ein Eisbad (0–2°C) überführt und dort der Schutzstrang zugegeben.

**[0045]** Die Reaktionsmischung wurde nun erfindungsgemäß längere Zeit, d. h. für 10 min in dem Eisbad gekühlt, dann für weitere maximal 110 min bei Raumtemperatur inkubiert.

**[0046]** Danach erfolgten bei allen Proben die Zugabe von  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  zu einer Endkonzentration von 2 mM und eine weitere Inkubation von 2 h.

**[0047]** Die Entfernung von  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  erfolgte in beiden Fällen über Nacht durch Dialyse.

**[0048]** Ergebnisse sind in **Fig. 1** gezeigt. Die nach der erfindungsgemäß modifizierten Methode von Thomas Reske hergestellten Targets (Verfahren 2) zeigen deutlich niedrigere Signale an drei unabhängig voneinander präparierten Elektroden (Au4, Au8, Au9).

**[0049]** Die Hybridisierung der so markierten Targets an die Sonden wurde bei Raumtemperatur für 15 min durchgeführt. Die verwendete Messmethode war die SWV (Square Wave Voltammetry): Scan  $-0.55 \text{ V}-0 \text{ V}$ , 200 Hz, Step Potential 0.002 V, Amplitude 0.04 V, verwendeter Puffer: 10 mM Tris, 0.5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 7.5.

Beispiel 2: Detektion von 0,9%-Spuren des MON810-Gens in der DNA einer Maisprobe durch Markierung mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ , Hybridisierung und elektrochemische Analyse.

**[0050]** Es wird eine PCR-Reaktion mit einem Template durchgeführt, das 0,9% [w/w] an transgener DNA (MON810-Gen) enthält. Bei der PCR wird ein transgener Abschnitt amplifiziert. Anschließend wird zur Denaturierung aller Doppelstränge auf  $95^\circ\text{C}$  für 10 min aufgeheizt. Dann wird der Schutzstrang im Überschuss zugesetzt. Dann wird die Probe erfindungsgemäß in einer Kältemischung aus Eis/NaCl für 10 min auf  $-2,5^\circ\text{C}$  abgekühlt. Nun wird der Schutzstrang thermisch stringent an die passenden Sequenzen in der Mais-DNA angelagert. Anschließend wird  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  (bevorzugt 2 mM) zugesetzt. Nach Ablauf der Reaktion kann das überschüssige  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  durch Dialyse abgetrennt werden. Zum Schluss erfolgt die Hybridisierung mit an Gold immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge und die elektrochemische Detektion z. B. mittels SWV. Der große Überschuss an unspezifischer DNA und RNA wurde im Markierungsschritt mit dem Osmiumtetroxid-Komplex markiert und ist seitdem nicht mehr zur Hybridisierung fähig. Daher erhält man nur dann voltammetrische Signale des Osmiumtetroxid-Komplex-Markers, wenn der Schutzstrang sein Gegenstück (MON810-Abschnitt) in der amplifizierten Mais-DNA finden und damit hybridisieren konnte.

Beispiel 3: Untersuchung der Genexpression durch Markierung der mRNA-Kopien mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ .

**[0051]** Die Nukleinsäureextrakte einer Zell- oder Gewebeprobe werden bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert und am Ende der Denaturierung mit den Schutzsträngen versetzt, mittels Kältemischung auf  $-2,5^\circ\text{C}$  abgeschreckt und anschließend bei Raumtemperatur mit den Schutzsträngen hybridisiert. Das Markierungsprinzip folgt dabei dem in Beispiel 1 vorgestellten. Allerdings ist hier darauf zu achten, dass bis zur Markierung der RNA auf RNase-Freiheit geachtet wird. Dann wird  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  (bevorzugt 2 mM) zugesetzt. Der größte Teil der Nukleinsäurestränge (DNA und RNA) liegt dabei einzelsträngig vor und wird dabei mit Osmiumtetroxid modifiziert und ist nicht mehr zur Bildung von Doppelsträngen in der Lage. Nur die geschützten Abschnitte der mRNA-Kopien bleiben unmarkiert und können daher anschließend mit den an Gold immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge hybridisieren. Dadurch werden einerseits eine hohe Selektivität und andererseits eine sehr hohe Empfindlichkeit bei der anschließenden elektrochemischen Analyse beispielsweise durch Chronopotentiometrie erreicht. Eine Vervielfältigung der mRNA-Kopien durch RT-PCR und PCR kann entfallen.

Beispiel 4: Detektion von Bakterienzellen durch Markierung der spezifischen rRNA mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ .

**[0052]** Die Nukleinsäureextrakte einer klinischen Probe werden bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert und mit den Schutzsträngen versetzt, erfindungsgemäß sehr schnell mittels Kältemischung auf  $-2,5^\circ\text{C}$  abgeschreckt und anschließend bei Raumtemperatur mit den Schutzsträngen hybridisiert. Dann wird  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  (bevorzugt 2 mM) zugesetzt. Der größte Teil der Nukleinsäurestränge (DNA und RNA) liegt dabei einzelsträngig vor, wird mit Osmiumtetroxid-Bipyridin modifiziert und ist nicht mehr zur Bildung von Doppelsträngen in der Lage. Nur die geschützten Abschnitte der rRNA-Kopien können anschließend mit den an Gold immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge hybridisieren. Dadurch werden einerseits eine hohe Selektivität und andererseits eine sehr hohe Empfindlichkeit bei der anschließenden elektrochemischen Analyse beispielsweise durch Chronopotentiometrie erreicht. Eine Vervielfältigung der rRNA-Kopien durch RT-PCR und PCR entfällt komplett. Dieses Prinzip kann zur Identifizierung und Quantifizierung infektiöser Bakterien in klinischen Pro-



ben verwendet werden. Auch in diesem Fall ist es wesentlich, auf RNase-Freiheit zu achten, bis die RNA mit  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$  markiert ist.

Beispiel 5: Elektrochemische Analyse der Os-markierten Nukleinsäuren direkt im Anschluss an die Markierungsreaktion ohne vorherige Entfernung des überschüssigen gelösten  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ .

**[0053]** Durch Anwendung der Chronocoulometrie kann man zwischen den elektrochemischen Signalen der immobilisierten Osmiumverbindungen und denen der gelösten  $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -Moleküle unterscheiden. Daher ist eine Entfernung überschüssiger Osmiumkomplexe nicht notwendig. Zur Durchführung müssen die immobilisierten Sonden mit passenden Sonden-Schutzsträngen geschützt sein. Letztere sind komplementär zu den immobilisierten Sonden, enthalten vorzugsweise aber ebenfalls 3 bis 5, bevorzugt 4 Basenfehlpaarungen, um die Hybridisierung von Sonde und Target zu fördern. Der Potentialsprung erfolgt von  $-500$  zu  $-200$  mV (vs. SCE). Zur Auswertung wird analog zum Verfahren nach Steel et al. (Steel et al., Anal. Chem. 1998, 70, 4670–4677, Fig. 4) verfahren, d. h. die Auftragung der chronocoulometrischen Messwerte erfolgt gegen die Quadratwurzel der Zeit. Der lineare Abschnitt wird bis  $t = 0$  extrapoliert, der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ladungsachse ergibt die Ladung als Messwert. Hiervon ist noch der Leerwert abzuziehen, der durch die kapazitive Umladung der elektrochemischen Doppelschicht entsteht. Die resultierende Ladung ist auf den elektrochemischen Umsatz der an der Sondenschicht mit dem Target immobilisierten Marker zurückzuführen und proportional zur Targetkonzentration.

Beispiel 6: Elektrochemische Analyse der Os-markierten Nukleinsäuresequenzen durch thermisch stringente Hybridisierung an selektiv geheizten Elektrodenarrays.

**[0054]** Jede einzelne Elektrode wird bei der Analyse auf eine Temperatur gebracht, bei der die darauf immobilisierte Fängersonde optimal und thermisch stringent mit der Zielsequenz hybridisiert. Dies unterstützt zusätzlich die spezifische Detektion der unterschiedlichen Zielsequenzen in Gegenwart eines großen Überschusses an unspezifischen Nukleinsäuren. Elektrodenarrays, welche im Rahmen der Erfindung verwendet werden können, sind z. B. in der Dissertation von Duwensee H., 2009 oder in DE 10 2004 017 750 B4 beschrieben.

Beispiel 7: Elektrochemische Analyse der Os-markierten Sequenzen an nanostrukturierten Elektroden.

**[0055]** Die Abscheidung von Nanostrukturen aus Gold und/oder Silber vergrößert die aktive Elektroden-Oberfläche und verbessert sowohl die Hybridisierungseffizienz und Stringenz, als auch die Empfindlichkeit und das Signal-Rausch-Verhältnis. Daher werden die Nachweisgrenze sowie die Selektivität weiter verbessert. Geeignete Nanostrukturen sind bei Wachholz et al., Electroanalysis 21 (19) (2009) 2153 oder French R et al. J Electroanal Chem 632 (2009) 206 und French R et al. Electroanalysis 20 (22) (2008) 2403 beschrieben. Die Abscheidung kann sowohl aus cyanidischen als auch aus anderen galvanischen Bädern nach dem Stand der Technik erfolgen.

Literatur;

**[0056]**

- Foita et al., 1 Am. Chem. Soc. 126 (2004) 6532.
- Kostecka et al., Bioelectrochemistry 63 (2004) 245.
- Foita et al., Electroanalysis 15 (2003) 431.
- Flehsig et al., Langmuir 21 (2005) 7848.
- Flehsig et al., Anal. Chem 79 (2007) 2125.
- French R et al., J Electroanal Chem 632 (2009) 206
- French R et al., Electroanalysis 20 (22) (2008) 2403
- Reske et al., Talanta 74 (2007) 393
- Mix et al., Electroanalysis 21 (2009) 826
- F. Wachholz et al., Electroanalysis 21 (2009) 2153
- Steel et al., Anal. Chem. 1998, 70, 4670–4677
- H. Duwensee, M. Mix, G.-U. Flehsig, Bioanalytical Reviews 1–4 (2010) 103
- Reske, Dissertation, 2009
- DE 10 2005 039 726 B3
- DE 10 2004 017 750 B4
- WO 2007/020093 A2

## SEQUENCE LISTING

<110> Universität Rostock  
 <120> Sequenzspezifische Analyse von Nukleinsäuren  
 <130> P85544  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer S1  
 <400> 1  
 actgccaagt gctcattaaa tcag 24  
 <210> 2  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer CUF1  
 <400> 2  
 caaggccatg cgattcg 17  
 <210> 3  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Sonde V2CA  
 <400> 3  
 tgccttcggg ctctttgaaa aaaaaaaaaa aaa 33  
 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Schutz Canda  
 <400> 4  
 taccttcagg ctctttag 18

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.**

### Patentansprüche

1. Verfahren zum sequenzspezifischen Nachweis von Nukleinsäuren in einer Probe, in der die Nukleinsäuren zumindest partiell als Doppelstrang vorliegen, Schritte umfassend, bei denen man
  - a) die zumindest partiell doppelsträngigen Nukleinsäurestränge durch thermische Denaturierung in Einzelstränge überführt, welche als Targetstränge bezeichnet werden,
  - b) mindestens einen als Schutzstrang bezeichneten Nukleinsäurestrang hinzufügt, welcher mit einem Targetstrang hybridisieren kann, um partielle Doppelstrangabschnitte auszubilden, wobei die Schutzstränge kürzer als die Targetstränge sind, wobei die Temperatur der Probe schnell auf eine Temperatur von weniger als 5°C, bevorzugt weniger als 0°C gesenkt wird,
  - c) die verbliebenen Einzelstrangabschnitte der Targetstränge durch Reaktion mit einem Redoxmarker markiert, der selektiv mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe der Nukleinsäurestränge reagieren und eine elektroanalytisch nutzbare Redoxreaktion an Arbeitselektroden ermöglicht, man
  - d) die so markierten Nukleinsäurestränge an der Oberfläche einer Elektrode mit dort immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge hybridisiert und man
  - e) die an den Sondensträngen hybridisierten Nukleinsäurestränge elektroanalytisch nachweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die thermische Denaturierung in Schritt a) bei mindestens 93°C, bevorzugt bei 95°C für länger als 1 min, bevorzugt für mindestens 5 min, mehr bevorzugt für mindestens 10 min stattfindet.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Hinzufügen des Schutzstranges in Schritt b) etwa bei der Temperatur der thermischen Denaturierung erfolgt.
4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur der Probe schnell auf eine Temperatur von weniger als 0°C gesenkt wird, indem die Probe sofort nach Hinzufügen des Schutzstranges in Schritt b) in eine Umgebung von weniger als 0°C überführt wird.
5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur der Probe in Schritt b) ca. -1,5°C bis -3°C beträgt, bevorzugt -2,5°C wobei diese Temperatur insbesondere in einer Kältemischung aus Eis mit einem Salz, bevorzugt NaCl, erreicht wird.
6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur in Schritt b) mindestens 1 min, bevorzugt mindestens 5 min oder mehr bevorzugt mindestens 10 min gehalten wird.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der Schutzstrang höchstens halb so lang ist wie der Targetstrang, wobei der Schutzstrang bevorzugt eine Länge von 10–200 b aufweist, mehr bevorzugt von 20–30 b, wobei der Schutzstrang bevorzugt so ausgestaltet ist, dass in den Doppelstrangabschnitten aus Schutzstrang und Targetstrang eine oder mehrere Fehlpaarungen auftreten, und/oder wobei der Schutzstrang in einem Überschuss von mindestens 2:1, bevorzugt 3:1, 4:1, 5:1, 9:1 oder 10:1 hinzugefügt wird.
8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmarker, der selektiv mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe der Nukleinsäurestränge reagiert und eine elektroanalytisch nutzbare Redoxreaktion an Arbeitselektroden ermöglicht, ein Osmium(VIII)-Komplex ist, bevorzugt [OsO<sub>4</sub>(bipy)] oder [OsO<sub>4</sub>(py)<sub>2</sub>]
9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren in der Probe RNA und/oder DNA sind.
10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren in der Probe vor der Denaturierung in Schritt a) in kürzere Abschnitte geteilt werden, z. B. von jeweils 100 bis 5000 Basenpaaren, vorzugsweise 500 bis 2000 Basenpaaren, wobei dies optional mit Nuklease-Behandlung oder Restriktionsendonuklease-Behandlung erreicht werden kann.
11. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Verdrängung der Schutzstränge durch die immobilisierten Sondenstränge bei einer Temperatur erfolgt, die optimal für die thermisch stringente Hybridisierung von Sonden- und Targetsträngen ist, wobei die Sondenstränge bevorzugt an einer beheizten Elektrode immobilisiert sind, wobei optional mehrere unterschiedliche Sonden verwendet wer-

den, die an unterschiedlichen selektiv beheizten Elektroden immobilisiert sind, um während der Hybridisierung und/oder Messung die für jede Sondensequenz jeweils optimale Temperatur einzustellen.

12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Schritt c) und d) die überschüssigen Redoxmarker aus der Analysenlösung entfernt werden, z. B. durch Dialyse oder Filtration.

13. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Schritt c) und d) die überschüssigen Redoxmarker aus der Analysenlösung nicht entfernt werden, sondern in der Probe verbleiben, wobei die elektrochemischen Signale des oberflächlich gebundenen Osmiums von den Signalen des in Lösung befindlichen Osmiums bei der Detektierung durch geeignete elektrochemische Analyseverfahren, vorzugsweise durch Chronocoulometrie oder Chronopotentiometrie, voneinander getrennt werden.

14. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorstehenden Ansprüche, umfassend ein Fließsystem, in welchem die Schritte des Verfahrens nacheinander stattfinden können, wobei es in dem Fließsystem heizbare Abschnitte zur thermischen Denaturierung sowie kühlbare Abschnitte zur schnellen Kühlung der Probe gibt.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie als elektrochemischen Detektor zum elektroanalytischen Nachweis der an den Sondensträngen hybridisierten Nukleinsäurestränge ein Array aus unterschiedlichen selektiv heizbaren Arbeitselektroden umfasst, wobei an den Arbeitselektroden unterschiedliche Sonden immobilisiert sind.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

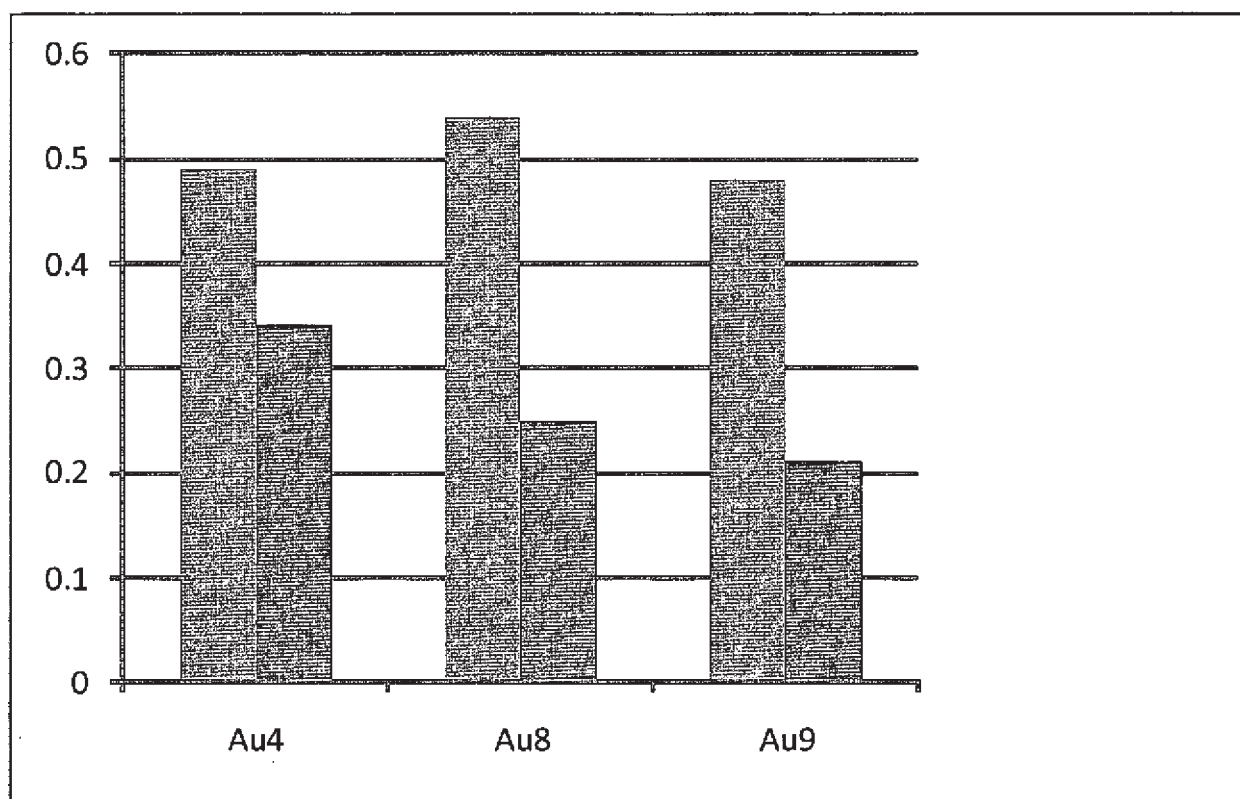


Fig. 2

